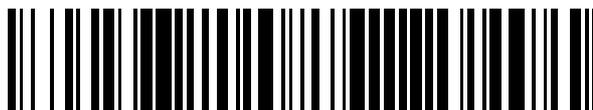


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 077**

51 Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 13177423 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2657697**

54 Título: **Métodos para determinar el riesgo de anomalías cromosómicas en un feto**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23776 P

04.02.2008 US 25890 P

09.06.2008 US 60048 P

11.06.2008 US 60732 P

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

20.10.2016

73 Titular/es:

WALLAC OY (50.0%)

P.O. Box 10

20101 Turku, FI y

THE FETAL MEDICINE FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

NICOLAIDES, KYPROS y

CUCKLE, HOWARD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 587 077 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

Métodos para determinar el riesgo de anomalías cromosómicas en un feto

5 **Antecedentes**

Cada año, dan a luz al menos 126 millones de mujeres en todo el mundo. Más de 20 millones de ellas sufren una complicación o enfermedad relacionada con el embarazo. Por ejemplo, los trastornos hipertensivos tales como la preeclampsia afectan a más del 10 % de los embarazos en total y son una de las principales causas de mortalidad materna. Una adecuada atención sanitaria prenatal aumenta la posibilidad de que se detecten dichas complicaciones y enfermedades. En muchos países son habituales los métodos de exploración para determinar el riesgo de sufrir complicaciones prenatales y/o anomalías fetales con el propósito de ayudar al tratamiento y asesoramiento de las embarazadas. Por ejemplo, en toda Europa, los Estados Unidos y algunas regiones de Asia, los profesionales sanitarios suelen realizar una exploración de anomalías cromosómicas fetales mediante marcadores bioquímicos presentes en la sangre materna. Dicha exploración resulta de ayuda a la hora de identificar a aquellas mujeres que presentan un riesgo lo bastante alto que justifique pruebas diagnósticas adicionales, que pueden resultar agresivas y conllevar un riesgo para el feto. Asimismo, la sangre materna y otros líquidos contienen marcadores bioquímicos que pueden utilizarse para detectar enfermedades relacionadas con el embarazo en la mujer. Aun así, en la actualidad no se han adoptado exploraciones sistemáticas para la detección precoz de la preeclampsia mediante muestras maternas. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar métodos precisos de exploración de complicaciones prenatales y/o anomalías fetales.

Spencer et al, Pre-Natal Diagnosis, volumen 21 n.º 9, septiembre de 2001, páginas 718-722 describe la medición de PIGF, PAPP-A, y beta-hCG en el suero materno de embarazos con trisomía 21 o trisomía 18 fetal durante el primer trimestre.

Spencer et al, Ultra Sound in Obstetrics and Gynaecology, volumen 13 n.º 4, abril de 1999, páginas 213-237 describe un programa de exploración respect de la trisomía 21 a las 10-14 semanas usando una combinación de la edad materna con el espesor de la translucencia nucal y beta-hCG y PAPP-A en suero.

30 **Sumario**

La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto, siendo el método de acuerdo con la reivindicación independiente 1.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un aparato para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto, siendo el aparato de acuerdo con la reivindicación independiente 11.

Las características adicionales de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

La presente divulgación proporciona un método para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto. El método implica determinar la cantidad de factor de crecimiento placentario (PIGF), de proteína plasmática asociada al embarazo A (PAPP-A) y de gonadotropina coriónica humana libre (beta hCG libre) en una o más muestras de sangre tomadas de un individuo gestante; y determinar el riesgo de la anomalía cromosómica en el feto usando las cantidades medidas de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una realización, la anomalía cromosómica se selecciona entre el grupo que consiste en trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía. En una realización, el método puede incluir determinar uno o más marcadores de ultrasonidos del feto y determinar el riesgo de la anomalía cromosómica en el feto usando las cantidades de PIGF, PAPP-A, beta hCG libre y los uno o más marcadores de ultrasonidos. El marcador de ultrasonidos puede ser, por ejemplo, la translucencia nucal. En una realización, el método también puede implicar determinar la cantidad de al menos un marcador bioquímico seleccionado entre la proteína placentaria 13 (PP13) y metaloproteasa 12 (ADAM12) y determinar el riesgo de la anomalía cromosómica en el feto usando las cantidades de PIGF, PAPP-A, beta hCG libre y el al menos un marcador bioquímico. En una realización, las una o más muestras biológicas se extraen de la gestante en el primer trimestre del embarazo, por ejemplo, entre las semanas 10 a 19 del embarazo, tal como en las semanas 11 a 13 del embarazo. En una realización, la determinación incluye calcular un riesgo final basándose en el riesgo anterior de desarrollar una anomalía cromosómica y una serie de relaciones de probabilidad basadas en las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. Opcionalmente, se lleva a cabo un análisis Gaussiano multivariable para determinar las relaciones de probabilidad. En una realización, también se usan las relaciones de probabilidad para uno o más parámetros del historial materno.

También se proporciona un aparato para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto. El aparato incluye un medio para introducir datos para introducir las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre en una o más muestras de sangre obtenidas de un individuo gestante; y un medio de cálculo para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto usando las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una realización, el aparato incluye además medios para introducir al menos una de las cantidades de ADAM12 y PP13 en una o más muestras de sangre obtenidas de la gestante; y determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto

usando las cantidades de al menos una de las cantidades de ADAM12 y PP13 y las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una realización, el aparato determina además el riesgo de desarrollar preeclampsia e incluye un medio para introducir datos para introducir la presión sanguínea de la gestante; y un medio de cálculo para determinar el riesgo de preeclampsia usando las cantidades introducidas de uno o más de P1GF y PAPP-A y la presión sanguínea.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** es un diagrama cajas y bigotes del múltiplo de la mediana (MoM) del factor de crecimiento placentario (PIGF) de cuatro grupos de resultados del embarazo: de control, de preeclampsia (PE) precoz, de PE tardía, de hipertensión gestacional (HG), que muestra que el valor de PIGF en muestras biológicas de gestantes es menor cuando la gestante presenta preeclampsia precoz o preeclampsia tardía, y ligeramente menor cuando la gestante presenta hipertensión gestacional.

La **figura 2** es un par de diagramas de dispersión que representan la relación entre el log MoM del factor de crecimiento placentario (PIGF) y el log MoM de PAPP-A de un grupo de control (A) y un grupo de preeclampsia (B), que muestra una modesta correlación entre los valores de PIGF y PAPP-A tanto en gestantes no afectadas como en las que presentan preeclampsia.

La **figura 3** es un par de diagramas de dispersión que representan la relación entre el log MoM del factor de crecimiento placentario (PIGF) y el log MoM del IP de la arteria uterina de un grupo de control (A) y un grupo preecláptico (B), que muestra una correlación negativa entre PIGF e IP.

La **figura 4** es un diagrama de dispersión que representa la correlación entre PP13 medida mediante un inmunoensayo ELISA y un inmunoensayo DELFIA de PerkinElmer en grupos preeclápticos y grupos no afectados.

La **figura 5** es un diagrama de dispersión que representa la correlación entre PIGF y PP 13 en la preeclampsia precoz en mujeres caucásicas y no caucásicas.

La **figura 6** es un diagrama de dispersión que representa la relación entre el log MoM del factor de crecimiento placentario (PIGF) y el log MoM de la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) en embarazos euploides (puntos negros y recta de regresión discontinua) y con trisomía 21 (círculos blancos y recta de regresión continua), que muestra una correlación entre PIGF y PAPP-A tanto en gestantes no afectadas como en las que presentan preeclampsia.

La **figura 7** es un diagrama cajas y bigotes que representa un valor menor del factor de crecimiento placentario (PIGF) en muestras biológicas de gestantes portadoras de fetos afectados por la trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía con respecto a fetos no afectados.

Descripción detallada

Los métodos, aparatos, perfiles clínicos y kits descritos en el presente documento resultan de utilidad para determinar el riesgo de que una gestante padezca preeclampsia (PE) y trastornos placentarios relacionados. Tal como se describe, dicho riesgo se puede determinar en función de los valores de marcadores bioquímicos, tales como el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) presentes en una muestra biológica tomada de la gestante, en combinación con la tensión arterial de la gestante. Asimismo, se pueden utilizar marcadores bioquímicos adicionales, como PP13, y marcadores biofísicos, como el índice de pulsatilidad de la arteria uterina, así como parámetros de la historia materna a la hora de determinar el riesgo de preeclampsia de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Asimismo, en el presente documento se describen métodos, aparatos, perfiles clínicos y kits que resultan de utilidad para determinar el riesgo de que una gestante sea portadora de un feto que presenta una anomalía cromosómica (AC) tal como el síndrome de Down. Tal como se describe, el riesgo se puede determinar en función de los valores de PIGF, PAPP-A y la fracción libre de la gonadotropina coriónica humana (beta hCG libre) presentes en una muestra biológica tomada de la gestante. Asimismo, se pueden utilizar marcadores bioquímicos y marcadores biofísicos adicionales (tales como marcadores ecográficos fetales), así como parámetros de la historia materna, a la hora de determinar el riesgo de anomalías cromosómicas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Como se describe en el ejemplo comparativo 1, se llevó a cabo un análisis estadístico de una población clínica, que demostró que las combinaciones de marcadores bioquímicos, entre los que se incluyen PAPP-A, PIGF y PP13, y de marcadores biofísicos, entre los que se incluyen la tensión arterial y el índice de pulsatilidad del Doppler uterino, resultaron de notable eficacia para determinar el riesgo de preeclampsia, con unas tasas de detección y de falsos positivos aceptables desde el punto de vista clínico. Por ejemplo, el PIGF y la tensión arterial, tanto teniendo en cuenta los factores maternos como sin tenerlos en cuenta, ofreció una detección de un 68 % con un 10 % de falsos

positivos. Entre los ejemplos adicionales específicos no restrictivos para determinar el riesgo de preeclampsia precoz y tardía se incluyen: PAPP-A y tensión arterial; PIGF y PAPP-A y tensión arterial; PIGF, PAPP-A, PP 13 y tensión arterial; PIGF y PP 13 y tensión arterial; PAPP-A y PP13 y tensión arterial (para las tasas de detección véanse, por ejemplo, las tablas 4, 6 y 10 para la preeclampsia precoz y las tablas 7 y 10 para la preeclampsia tardía). En el presente documento, el “% de detección” es la proporción expresada en porcentaje de gestantes afectadas (por ejemplo, preeclámpticas) con un resultado positivo. El “% de falsos positivos” es la proporción expresada en porcentaje de gestantes no afectadas con un resultado positivo. El poder de predicción de un marcador o combinación de estos se suele expresar en términos de la tasa de detección para una tasa de falsos positivos dada.

La selección de una combinación concreta de marcadores bioquímicos y biofísicos, de entre los descritos en el presente documento, para que se utilicen en un entorno clínico o en otros entornos de laboratorio puede depender de varias consideraciones de carácter práctico, entre las que se incluye el equipo médico disponible y reactivos de pruebas de marcadores bioquímicos en el entorno concreto. Por ejemplos, en entornos donde se cuenta con un aparato de ecografía Doppler, es probable que un profesional sanitario incluyera el IP a la hora de determinar el riesgo de preeclampsia. En ambientes médicos que no están equipados con un equipo avanzado (como un aparato de ecografía Doppler), se puede realizar una evaluación del riesgo aceptable desde el punto de vista clínico mediante la tensión arterial y los niveles de marcadores bioquímicos, tal como se describe en el presente documento.

Asimismo, en el presente documento se describe el hallazgo de que el valor del marcador bioquímico PIGF en la sangre materna tiene un poder de predicción para determinar el riesgo de anomalías cromosómicas fetales. De este modo, cuando una prueba de exploración de anomalías cromosómicas incluye la prueba del PIGF, también es posible determinar el riesgo de preeclampsia. Para ello, lo único que sería necesario sería una lectura de la tensión arterial materna. Asimismo, a la hora de determinar el riesgo de preeclampsia, pueden utilizarse parámetros adicionales que normalmente se recopilarían en el transcurso de una exploración prenatal y que se utilizarían habitualmente a la hora de determinar el riesgo de anomalías cromosómicas fetales. Como se describe en el ejemplo comparativo 3, a la hora de emplear los métodos para determinar el riesgo de preeclampsia, también puede determinarse el riesgo de trastornos relacionados, como por ejemplo restricción del crecimiento fetal, parto prematuro e hipertensión gestacional.

En el presente documento, el término “preeclampsia” se refiere al trastorno del embarazo caracterizado en parte por la hipertensión gestacional y la proteinuria. En mujeres previamente normotensas, la PE se define normalmente como hipertensión gestacional con proteinuria y la PE grave como hipertensión gestacional grave con proteinuria. En mujeres con hipertensión crónica, la PE sobreañadida se define normalmente como la nueva aparición de proteinuria. Los aspectos de la PE que resultan de utilidad para diagnosticar la PE se pueden clasificar según las directrices expuestas por diversas organizaciones médicas. Por ejemplo, la hipertensión gestacional, de acuerdo con las directrices de la International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (Davey *et al.*, *Am. J. Obstet Gynecol*; 158; 892098, 1988), se describe como dos registros de tensión arterial diastólica de 90 mm Hg o superior al menos con 4 horas de separación e hipertensión grave como la tensión de al menos 110 mm Hg o superior al menos con 4 horas de separación o un registro de tensión arterial diastólica de al menos 120 mm Hg. La proteinuria se define como una excreción de 300 mg o superior en 24 horas o, si no fue posible una recogida de 24 horas, dos registros de 2+ o superior en análisis con tiras reactivas de muestras de orina de la micción media o con sonda. Por lo general, las mujeres se clasifican como normotensas previas o con hipertensión crónica antes de las 20 semanas de gestación. Se entiende que la preeclampsia es un trastorno con un espectro de trastornos relacionados, entre los que se incluye el retraso del crecimiento intrauterino, el aborto precoz, el parto prematuro y la muerte fetal intrauterina. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, se ha sugerido que el retraso del crecimiento intrauterino refleja una adaptación del cuerpo de la embarazada para hacer frente al trastorno de la preeclampsia, que permite que el feto sobreviva. Por otro lado, es posible que el aborto precoz y el parto prematuro reflejen una adaptación del cuerpo de la embarazada para hacer frente al trastorno de la preeclampsia, que permite que la mujer sobreviva. En ese contexto, la muerte fetal intrauterina supondría un fracaso de dicha adaptación. Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento para determinar el riesgo de preeclampsia también pueden utilizarse para determinar el riesgo de padecer trastornos relacionados con la preeclampsia en el espectro de la preeclampsia.

En aquellos casos en los que se determina que una gestante presenta un riesgo aumentado de padecer preeclampsia mediante un método descrito en el presente documento, la paciente puede recibir tratamiento o asesoramiento sobre su estilo de vida por parte de un profesional sanitario. A pesar de que no existe un tratamiento de uso extendido para la preeclampsia, diversos estudios han demostrado las ventajas de tratamientos como por ejemplo antihipertensivos, como sulfato de magnesio, aspirina, diazepam y fenitoína; y suplementos dietéticos como vitamina D, calcio y selenio.

La preeclampsia puede aparecer tan pronto como a las 20 semanas de gestación y, por lo general, se considera “preeclampsia precoz” cuando aparece antes de las 32-34 semanas de gestación aproximadamente, y “preeclampsia tardía” cuando aparece después de las 32-34 semanas de gestación aproximadamente. La preeclampsia precoz se asocia con una morbilidad aumentada y, por consiguiente, se considera una forma más

grave de preeclampsia. Los métodos para determinar el riesgo de PE descritos en el presente documento resultan de utilidad para realizar una exploración de “preeclampsia precoz” y “preeclampsia tardía”. Como se describe en el presente documento, por ejemplo, en el ejemplo comparativo 1, los métodos para determinar el riesgo de preeclampsia son eficaces en el periodo inferior a las 34 semanas de gestación, inclusive; inferior a las 36 semanas de gestación, inclusive, como de 34 a 36 semanas de gestación, inclusive, inferior a las 37 semanas de gestación, inclusive y mayor a las 37 semanas de gestación, inclusive.

Los ejemplos comparativos 1 a 3 describen que el riesgo de preeclampsia precoz y tardía (<34 semanas, 32-34 semanas y 37+ semanas) se puede determinar por medio de marcadores bioquímicos y biofísicos concretos, a través de muestras de sangre que se tomaron entre las 11 y las 19 semanas de gestación. De este modo, para su uso en los métodos de detección de la preeclampsia, puede tomarse una muestra aproximadamente entre las 11 y las 37 semanas de gestación, inclusive, lo que incluye entre aproximadamente las 11 y las 20 semanas, inclusive, entre aproximadamente las 11 y las 34 semanas, entre aproximadamente las 20 y las 34 semanas y, de manera más general, aproximadamente antes de las 20 semanas, dentro del primer trimestre, aproximadamente después de las 10 semanas, dentro del segundo trimestre y dentro del tercer trimestre. Aunque en ocasiones realizar pruebas más tempranas es una política beneficiosa desde el punto de vista de la sanidad pública, se entiende que la recogida de muestras puede verse a veces afectada por consideraciones de tipo práctico, como que una mujer retrase la visita a su profesional sanitario hasta encontrarse en unas semanas de gestación relativamente más tardías.

En determinadas circunstancias, se pueden tomar muestras biológicas de una gestante en más de una ocasión, por ejemplo, cuando su trastorno hipertensivo y/o placentario requiere supervisión para controlar la aparición de preeclampsia debido a un riesgo *a priori*, la presencia de síntomas y/u otros factores. Los métodos para determinar el riesgo de preeclampsia descritos en el presente documento también se pueden utilizar para supervisar a una gestante que está siendo sometida a una terapia o tratamiento para un trastorno hipertensivo y/o placentario. Si se desea, la prueba de marcadores bioquímicos y/o biofísicos puede llevarse a cabo en un entorno doméstico, por ejemplo, mediante formatos de prueba bioquímica con tiras reactivas y tensiómetros automáticos de uso doméstico.

Los métodos para determinar el riesgo de preeclampsia en una gestante implican la determinación del valor de uno o varios marcadores bioquímicos seleccionados entre PIGF y PAPP-A. Asimismo, los valores de marcadores bioquímicos adicionales, como PP 13, pueden utilizarse en los métodos. En el presente documento, el término “PIGF” se refiere al factor de crecimiento en mamíferos que presenta una secuencia de aminoácidos homóloga al número de referencia de GenBank P49763. En el presente documento, el término “PAPP-A” se refiere a la metaloproteínasa metzincina denominada proteína plasmática A asociada al embarazo y que presenta una secuencia de aminoácidos homóloga al número de referencia de GenBank AAH78657. En el presente documento, el término “PP13” se refiere a la proteína placentaria 13, también denominada galectina-13, que presenta una secuencia de aminoácidos homóloga al número de referencia de GenBank NP_037400.

Los métodos descritos en el presente documento implican la determinación de la tensión arterial de una paciente. Pueden utilizarse una o más de una tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica y tensión arterial media de la gestante. La tensión arterial media (TAM) se refiere al promedio de la tensión arterial en un ciclo cardíaco y se determina mediante el gasto cardíaco (GC), la resistencia vascular sistémica (RVS) y la tensión venosa central (PVC) mediante procedimientos establecidos. Un profesional sanitario puede utilizar cualquier método para medir la tensión arterial de la gestante, lo que incluye, por ejemplo, métodos de palpación, métodos auscultatorios y métodos oscilométricos. Asimismo, puede utilizarse un equipo de medición automática de la tensión arterial. Los métodos descritos en el presente documento también pueden implicar la determinación del índice de pulsatilidad (IP) de la arteria uterina, que es un índice de onda de la velocidad del flujo sanguíneo arterial que cuantifica la pulsatilidad u oscilaciones de la onda. El IP de la gestante puede medirse mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una ecografía Doppler de la arteria uterina por vía transvaginal o transabdominal. La arteria uterina se identifica en primer lugar mediante una ecografía Doppler color. A continuación, se puede realizar un Doppler pulsado para obtener ondas. A continuación, se pueden calcular diversos índices. Por ejemplo, el IP se puede calcular como el flujo sistólico pico menos el flujo diastólico mínimo dividido entre el flujo medio.

Los métodos para determinar el riesgo de preeclampsia en una gestante implican la utilización de una muestra biológica de la gestante. La muestra biológica puede ser cualquier muestra de líquidos corporales o tejidos que contengan los marcadores bioquímicos seleccionados. Los ejemplos comparativos 1 a 3 describen un uso de la sangre materna en forma de suero. A menudo, la elección de muestra biológica puede depender de los formatos de ensayo disponibles en un laboratorio clínico concreto para analizar los valores de marcadores. Por ejemplo, a algunos formatos de ensayo les falta la sensibilidad necesaria para analizar la sangre completa, de modo que un laboratorio clínico opta por analizar una fracción de la sangre, como el suero o por utilizar sangre desecada. Entre las muestras biológicas a modo de ejemplo que resultan de utilidad para los métodos descritos en el presente documento se incluyen sangre, productos de sangre purificada (como suero, plasma, etc.), orina, líquido amniótico, una biopsia de velloosidad coriónica, una biopsia placentaria y fluido cervicovaginal. Se pueden determinar los valores de marcadores bioquímicos presentes en una muestra biológica mediante cualquier formato de ensayo adecuado para medir proteínas en muestras biológicas. Un formato común de ensayo para este propósito es el inmunoensayo, que incluye, por ejemplo, enzimoensayos (EIA), como la técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado

(EMIT), el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA) y el enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunorradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA); fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA) y ensayos por quimioluminiscencia (CL).

Para determinar si el nivel de marcadores bioquímicos es mayor o menor de lo normal, se determina el nivel normal de marcador bioquímico presente en una muestra biológica materna de una población pertinente. La población pertinente puede definirse en función de cualquier característica que pueda afectar a los niveles normales (no afectados) de los marcadores. Para determinar el riesgo de preeclampsia, la población pertinente puede establecerse en función del riesgo bajo de preeclampsia. Una vez se conocen los niveles de marcador normales, pueden compararse los niveles de marcador determinados y determinarse la significación de la diferencia por medio de métodos estadísticos estándar. Cuando hay una diferencia estadística importante entre el nivel de marcador determinado y el nivel normal, existe un riesgo significativo de que la paciente sometida a la prueba llegue a padecer preeclampsia.

El riesgo de que una gestante padezca preeclampsia o sea portadora de un feto que presente una anomalía cromosómica puede determinarse a partir de los niveles de marcadores bioquímicos por medio de un análisis estadístico en función de datos clínicos recopilados en un estudio poblacional de pacientes. Los Ejemplos 1 a 3 muestran los resultados de dichos estudios. Existen varios métodos estadísticos de combinación de parámetros que caracterizan a la gestante, como los niveles de marcadores bioquímicos, para obtener una estimación del riesgo. Normalmente se utilizan para dicho propósito el método de probabilidad (Palomaki y Haddow, 1987) y el método de la función lineal discriminante (Norgarrd-Pedersen *et al. Clin. Genet.* 37, 35-43 (1990)). El principio básico del método de probabilidad es que se conocen las distribuciones poblacionales de un parámetro (como el nivel de un marcador bioquímico) para los grupos "no afectado" y "afectado". Por consiguiente, de cualquier parámetro dado (como el nivel de un marcador y la lectura de la tensión arterial), se puede calcular la probabilidad de pertenencia a los grupos "no afectado" y "afectado". La probabilidad se calcula como la altura gaussiana del parámetro en función de la media poblacional y la desviación estándar. La "razón de probabilidad" es la razón de las alturas calculadas por medio de los parámetros poblacionales "no afectados" y "afectados" y es una expresión del riesgo aumentado de presentar un trastorno con respecto a un riesgo *a priori*.

Las posibilidades (que es una expresión estadística relacionada con un riesgo *a priori*, como se describe más adelante en el presente documento) *a priori* de una mujer de presentar preeclampsia o ser portadora de un feto con una anomalía cromosómica se pueden calcular por medio de una fórmula derivada de estudios clínicos poblacionales (Cuckle *et al.* 1987). Estas posibilidades *a priori* pueden modificarse por medio de la razón de probabilidad para derivar las posibilidades *a posteriori* que pueden utilizarse para la estimación del riesgo de preeclampsia o anomalía cromosómica. Se expone una descripción detallada de la utilización del método de probabilidad para predecir el riesgo de que un feto presente una anomalía cromosómica en, por ejemplo, *Screening for Down's Syndrome*, ed. J.G. Grudzinskas, T. Chard, M. Chapman y H. Cuckle; publicado por Cambridge University Press, 1994). Asimismo, es posible utilizar distribuciones de razones de probabilidad observadas para determinar el riesgo por medio de los métodos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, Spencer *et al. Ann. Clin. Biochem.*, 29, 506-18 (1992)).

A continuación sigue una visión general para determinar el riesgo de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento: un punto de partida de ejemplo es la determinación de las posibilidades *a priori*. En el caso del riesgo de anomalía cromosómica, las posibilidades *a priori* se derivan normalmente de la edad materna por medio de una fórmula de edad-riesgo. En el caso del riesgo de preeclampsia, las posibilidades *a priori* se derivan normalmente de un riesgo poblacional general. En la práctica actual de exploración de anomalías cromosómicas, los valores de marcadores bioquímicos se remiten a valores de la mediana suavizados para producir valores de múltiplos de la mediana (MoM) ajustados para estandarizar factores como el ensayo, la gestación, el peso materno, la condición de fumadora y similares. Ello se realiza, por ejemplo, porque como los valores de marcadores bioquímicos del cuerpo de la paciente cambian con la gestación, para el cálculo de los riesgos se ajusta el valor de marcador bioquímico para que no se vea afectado por la edad gestacional. El valor de un MoM de una muestra es la razón entre el valor de marcador bioquímico y el valor de la mediana poblacional en la misma edad gestacional (u otro parámetro). Se determinan las alturas gaussianas de los resultados de marcador bioquímico para los parámetros de población "no afectada" y "afectada". Se determina la razón entre la altura en la curva "no afectada" y la altura en la curva "afectada". Esta razón se multiplica por las posibilidades *a priori*.

Conceptualmente, para calcular el riesgo mediante tres marcadores bioquímicos se necesita en primer lugar que se definan las razones de probabilidad individuales de cada uno de los marcadores (corregidos en primer lugar según la edad materna) y que luego se multipliquen juntas. No obstante, se necesita un factor adicional en el cálculo para dar cuenta del alcance de la superposición de información (correlación) de los tres marcadores bioquímicos individuales. Normalmente, se utilizan valores de r para expresar la correlación entre parámetros, como en nuestro ejemplo de tres marcadores bioquímicos individuales. El Ejemplo 1 ofrece valores de r que corresponden a correlaciones entre diversos parámetros relevantes en el cálculo del riesgo de preeclampsia. El Ejemplo 4 ofrece valores de r que corresponden a correlaciones entre diversos parámetros relevantes en el cálculo del riesgo de anomalías

cromosómicas fetales. Se ha encontrado que otras variables influyen en los niveles en sangre materna de unos marcadores concretos, y dichas variables pueden ajustarse y los ajustes pueden incorporarse a la expresión final de los valores en forma de MoM.

5 Como se describe en el ejemplo comparativo 1, se llevaron a cabo análisis estadísticos de datos clínicos, entre los que se incluyen valores de marcadores bioquímicos como PIGF, PAPP-A, PP13 y de marcadores biofísicos como la tensión arterial y el IP, con el objetivo de determinar el riesgo de que una gestante padezca preeclampsia. En particular, los métodos descritos a continuación expresan la tensión arterial como una razón de probabilidad. Se trata de un enfoque único para determinar un riesgo de preeclampsia. Aunque en la práctica clínica anterior es normal que un profesional sanitario realice una lectura de la tensión arterial a la hora de atender a una paciente embarazada durante una consulta, hasta este momento se ha pasado por alto la utilización de la tensión arterial en un algoritmo para determinar el riesgo de preeclampsia.

15 En una forma de realización, el proceso estadístico para llevar a cabo la estimación del riesgo puede resumirse como se muestra a continuación. Se calcula un MoM para cada marcador bioquímico y biofísico. Después, el MoM o los MoM se ajustan en función de parámetros de la historia materna como la raza, el hábito tabáquico, la paridad, el IMC, la hipertensión, una preeclampsia anterior y una madre/hermana con una preeclampsia anterior. A continuación, se realiza un análisis gaussiano multivariable para determinar las razones de probabilidad. Para determinar el riesgo de preeclampsia, el riesgo *a priori* estaba basado en un riesgo poblacional general.

- 20 1. Riesgo *a priori*=1 entre x
2. Razón de probabilidad (RV)- raza=2,18 si es negra, 0,57 de otra raza
3. RV-fumadora=0,56 si es fumadora, 1,04 si es no fumadora
4. RV-paridad=1,34 si paridad 0, 0,66, 0,63; y 1,14 para 1, 2 y 3+
- 25 5. RV-IMC=0,65 si <25, 1,23; y 3,05 para 25-34 y 35+
6. RV-hipertensión=10,24 si hay enfermedad, 0,94 si no la hay
7. RV-historia=7,87 si embarazo previo con PE, 0,64 si ninguno, 1 si paridad 0
8. RV-familia=2,89 si la madre tuvo embarazo con PE, 0,92 si no lo tuvo
9. RV-marcador bioquímico (PIGF, PAPP-A, PP13, etc.) y perfil de marcador físico (tensión arterial o IP)
- 30 =razón entre alturas de distribuciones de frecuencia gaussianas multivariadas en embarazos con PE precoz y embarazos no afectados. Los parámetros de las distribuciones son, para cada marcador, medias y DE y, para pares de marcadores, los valores de r .
10. El riesgo final calculado al expresar el riesgo *a priori* en forma de posibilidades ($1:x-1$), multiplicar el antecedente por todas las RV y reformularlo como 1 entre y . Para calcular los riesgos *a posteriori*, primero se expresa el riesgo *a priori* en forma de posibilidades. Por consiguiente, 1 entre x se convierte en $1:(x-1)$. Las posibilidades *a priori* se multiplican por la RV para dar $RV:(x-1)$, que sigue siendo una posibilidad. Se puede volver a escribir como la posibilidades $1:(x-1)/RV$ y convertirla en un riesgo de 1 entre $[(1:(x-1)/RV)+1]$.

40 En otras formas de realización, el riesgo de preeclampsia puede determinarse con menos factores de riesgo *a priori* o sin incluirlos (véanse, por ejemplo, las Tablas 4 y 6).

Se entiende que los valores numéricos pueden ser distintos para distintas poblaciones de estudio, aunque los que se muestran más adelante ofrecen un punto de partida aceptable para los cálculos del riesgo. Por ejemplo, se ha observado que, para un centro clínico concreto que lleva a cabo análisis del riesgo de las pacientes, los valores numéricos de un algoritmo de riesgo pueden desviarse con el tiempo, puesto que la población en la región atendida varía con el tiempo.

50 Por consiguiente, la presente divulgación ofrece un método para determinar el riesgo de preeclampsia en una gestante. El método implica la determinación del valor de uno o varios marcadores bioquímicos seleccionados entre el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) de una o varias muestras biológicas de la paciente; la determinación de la tensión arterial de la paciente; y la determinación del riesgo de preeclampsia mediante el valor de cada uno del uno o los varios marcadores bioquímicos seleccionados y la tensión arterial de la paciente. En una forma de realización, el método implica además la determinación del índice de pulsatilidad (IP) de la arteria uterina de la paciente; y la determinación del riesgo de preeclampsia mediante el valor de cada uno del uno o los varios marcadores bioquímicos seleccionados y la tensión arterial de la paciente y el IP. En una forma de realización, el tipo de preeclampsia puede ser preeclampsia precoz. La preeclampsia tardía también puede detectarse por medio de los métodos. El marcador bioquímico puede ser, por ejemplo, PIGF. En otra forma de realización, puede ser PAPP-A. En una forma de realización adicional, el método puede emplear PIGF y PAPP-A. En una forma de realización, el método puede incluir también la determinación del valor de proteína placentaria 13 (PP13) y la determinación del riesgo de preeclampsia mediante el valor de cada uno del uno o los varios marcadores bioquímicos seleccionados, la tensión arterial de la paciente y el valor de PP13. La tensión arterial puede ser, por ejemplo, una tensión arterial media.

65 En una forma de realización, la determinación del riesgo puede incluir la determinación de una razón de probabilidad para la tensión arterial. La determinación del riesgo también puede incluir el cálculo de un riesgo final en función del riesgo *a priori* de la paciente de padecer preeclampsia y un conjunto de razones de probabilidad en función de los

valores del uno o los varios marcadores bioquímicos y la tensión arterial. En una forma de realización, se realiza un análisis gaussiano multivariable para determinar las razones de probabilidad. En una forma de realización, el método puede implicar además la utilización de razones de probabilidad para uno o varios parámetros de la historia materna seleccionados entre la raza, el hábito tabáquico, la paridad, el IMC, la hipertensión, una preeclampsia anterior y una madre/hermana con una preeclampsia anterior. En una forma de realización, el riesgo de preeclampsia en una paciente presenta una tasa de detección de al menos el 65 % aproximadamente y una tasa de falsos positivos del 10 % aproximadamente. En otra forma de realización, el riesgo de preeclampsia en una paciente presenta una tasa de detección de al menos el 75 % aproximadamente y una tasa de falsos positivos del 10 % aproximadamente. En una forma de realización adicional, el riesgo de preeclampsia en una paciente presenta una tasa de detección de al menos el 90 % aproximadamente y una tasa de falsos positivos del 10 % aproximadamente. En otra forma de realización más, el método para determinar el riesgo de preeclampsia en una paciente presenta una tasa de detección de al menos el 95 % aproximadamente y una tasa de falsos positivos del 10 % aproximadamente.

Asimismo, la presente divulgación ofrece un perfil clínico de una gestante, que incluye información como los valores de uno o varios marcadores bioquímicos presentes en una o varias muestras biológicas de la paciente, siendo los marcadores bioquímicos seleccionados entre el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A); y la tensión arterial de la gestante, donde el perfil clínico se almacena en un soporte legible por ordenador.

De manera adicional, se ofrece un aparato para determinar el riesgo de preeclampsia en una gestante. El aparato incluye un medio de entrada de datos adaptado para introducir los valores de uno o varios marcadores bioquímicos seleccionados entre el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) de una o varias muestras biológicas de la paciente, y la tensión arterial de la paciente; y un medio de cálculo adaptado para determinar el riesgo de padecer preeclampsia mediante los valores de entrada de los marcadores bioquímicos y la tensión arterial. En una forma de realización, el aparato también puede incluir un medio de entrada de datos adaptado para introducir uno o varios parámetros seleccionados entre la edad, la raza, el hábito tabáquico, la paridad, el IMC, la hipertensión, una preeclampsia anterior y una madre/hermana con una preeclampsia anterior y el IP, y un medio de cálculo adaptado para determinar el riesgo de padecer preeclampsia mediante los valores de entrada de los marcadores bioquímicos, la tensión arterial y uno o varios parámetros seleccionados.

En otro aspecto de los métodos descritos en el presente documento se proporciona un método para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto. Tal como se describe en el presente documento, determinar el riesgo de una anomalía cromosómica fetal implica la determinación de los valores de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre de una o varias muestras biológicas tomadas de la gestante y la determinación del riesgo de la anomalía cromosómica de un feto en función de los valores de PIGF, PAPP-A, y beta hCG libre. Asimismo, el método puede incluir la medición del valor de ADAM 12 de una muestra biológica tomada de la gestante, y la utilización del valor medido de ADAM 12 junto con los parámetros descritos anteriormente, para determinar el riesgo de anomalía cromosómica fetal.

Tal como se describe en el Ejemplo 4, se realizó un análisis estadístico de una población clínica, que reveló que las combinaciones de marcadores bioquímicos, entre los que se incluye PAPP-A, PIGF y beta hCG libre, y de marcadores biofísicos, entre los que se incluye la translucencia nucal (TN) fetal, resultaban de notable eficacia para determinar el riesgo de anomalía cromosómica de un feto con unas tasas de detección y de falsos positivos aceptables desde el punto de vista clínico. Por ejemplo, la beta hCG libre, la PAPP-A y el PIGF presentaron una tasa de detección del 70 % aproximadamente, con una tasa de falsos positivos del 5 %. Al incluir la edad materna en una determinación del riesgo con el mismo conjunto de marcadores bioquímicos, se obtuvo una tasa de detección del 80 % con una tasa de falsos positivos del 5 %.

En el presente documento, el término "anomalía cromosómica" se refiere a un número atípico de cromosomas o a una anomalía estructural en uno o varios cromosomas. El término abarca aneuploidías como la trisomía 21 (síndrome de Down), trisomía 18 (síndrome de Edwards) y trisomía 13 (síndrome de Patau) así como deleción cromosómica como el síndrome de Turner, que pueden detectarse por la presencia de valores anormales de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre en una muestra materna. En el presente documento, el término "beta hCG libre" se refiere a la subunidad beta libre de la coriogonadotropina humana, una hormona glicoproteica producida por el embrión durante el embarazo justo después de la concepción y más adelante por el sincitiotrofoblasto, y que presenta una secuencia de aminoácidos homóloga al número de referencia de GenBank NM_000737. El Ejemplo 4 muestra que la combinación de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre resulta de utilidad para detectar la trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, el síndrome de Turner y la triploidía (véase Figura 7).

Los métodos descritos en el presente documento para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto también pueden incluir la determinación de un marcador biofísico del feto. El marcador biofísico puede ser, por ejemplo, un marcador ecográfico, como una translucencia nucal (TN) fetal. La translucencia nucal es un marcador biofísico conocido del feto y se define como el espacio desde la parte posterior del cuello hasta la piel que cubre el cuello, y se refiere a una observación de que los fetos con anomalías tienden a mostrar una acumulación de líquido en dicha región y presentan un riesgo aumentado de tener presentes varias anomalías cromosómicas, entre

las que se incluye el hallazgo habitual del síndrome de Down. Generalmente, se realiza una ecografía de TN en el primer trimestre.

Los métodos descritos en el presente documento para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica del feto pueden realizarse en el primer trimestre de embarazo y/ o en el segundo trimestre de embarazo. Por consiguiente, puede tomarse la muestra biológica de la gestante en un momento entre las semanas 10 y 20 aproximadamente, entre las semanas 10 y 18 aproximadamente, entre las semanas 10 y 16 (inclusive) aproximadamente de gestación, como por ejemplo entre las semanas 11 y 13 (inclusive) de gestación.

Como se describe en el Ejemplo 4, se llevaron a cabo análisis estadísticos de datos clínicos, entre los que se incluyen valores de marcadores bioquímicos como PIGF, PAPP-A y beta hCG libre y marcadores biofísicos como la TN fetal, con el objetivo de determinar el riesgo de anomalía cromosómica de un feto. Un proceso estadístico de ejemplo para llevar a cabo la estimación del riesgo en función del PIGF, la PAPP-A y la beta hCG libre puede resumirse como se muestra a continuación.

El PIGF se expresa en MoM y peso corregido.

1. Un riesgo *a priori* (expresado en forma de posibilidades) se deriva de la prevalencia según la edad materna (y de la historia familiar de síndrome de Down, si es de aplicación).

2. Ello se multiplica por una RV de las distribuciones log-gaussianas de PIFG en embarazos con síndrome de Down y embarazos no afectados.

3. Los parámetros de distribución de no afectados son $DE=0,185$.

4. La media del síndrome de Down y la DE son medias= $\log_{10}(0,566)=-0,247$ y $DE=0,186$.

5. Las posibilidades finales se vuelven a convertir en un riesgo.

6. Para las combinaciones de PIGF con PAPP-A y beta hCG libre, se necesitan coeficientes de correlación entre los valores de log MoM en embarazos con síndrome de Down y embarazos no afectados. Embarazos no afectados: con PAPP-A es 0,278; con beta hCG libre es 0,085. Los valores de síndrome de Down son: 0,334 y 0,098.

7. Se puede presuponer una correlación cero con la TN.

8. Media= $\log_{10}(0,538)=-0,269$; $DE=0,226$; correlación con PAPP-A=0,056 y con beta hCG libre=-0,142.

El algoritmo y la metodología descritos anteriormente pueden modificarse para cualquier aneuploidia.

Se entiende que los valores numéricos pueden ser distintos para distintas poblaciones de estudio, aunque los que se muestran más adelante ofrecen un punto de partida aceptable para los cálculos del riesgo. Por ejemplo, se ha observado que, para un centro clínico concreto que lleva a cabo análisis del riesgo de las pacientes, los valores numéricos de un algoritmo de riesgo pueden desviarse con el tiempo, puesto que la población en la región atendida varía con el tiempo.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto. El método implica la determinación del valor del factor de crecimiento placentario (PIGF), la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y la subunidad libre de la coriogonadotropina humana (beta hCG libre) de una o varias muestras biológicas tomadas de una gestante; y la determinación del riesgo de la anomalía cromosómica del feto mediante los valores medidos de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una forma de realización, la anomalía cromosómica se selecciona del grupo que consiste en trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía. En una forma de realización, el método puede incluir la determinación de uno o varios marcadores ecográficos del feto y la determinación del riesgo de la anomalía cromosómica del feto mediante los valores de PIGF, PAPP-A, beta hCG libre, y el uno o los varios marcadores ecográficos del feto. El marcador ecográfico puede ser, por ejemplo, translucencia nucal. En una forma de realización, el método también puede implicar la determinación del valor de al menos un marcador bioquímico seleccionado entre proteína placentaria 13 (PP13) y metaloproteinasas 12 (ADAM12), y la determinación del riesgo de la anomalía cromosómica del feto mediante los valores de PIGF, PAPP-A, beta hCG libre y el al menos un marcador bioquímico. En una forma de realización, la una o las varias muestras biológicas son tomadas de la gestante en el primer trimestre de embarazo, por ejemplo, dentro de las semanas 10 a 19 de embarazo, como las semanas 11 a 13 de embarazo. En una forma de realización, la determinación incluye el cálculo de un riesgo final en función del riesgo *a priori* de padecer la anomalía cromosómica y un conjunto de razones de probabilidad en función de los valores de PIGF, PAPP-A, y beta hCG libre. De manera opcional, se realiza un análisis gaussiano multivariable para determinar las razones de probabilidad. En una forma de realización, las razones de probabilidad también se utilizan para uno o varios parámetros de la historia materna.

En la presente divulgación se ofrece un perfil clínico de una gestante, que incluye información para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto, donde la información incluye los valores de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre de una o varias muestras biológicas de la gestante, y donde el perfil clínico se almacena en un soporte legible por ordenador. Asimismo, el perfil clínico puede incluir información adicional para determinar el riesgo de padecer preeclampsia, donde la información adicional incluye la tensión arterial de la gestante.

También se proporciona un aparato para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto. El aparato incluye un medio de entrada de datos para introducir los valores de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre de una o varias muestras biológicas tomadas de una gestante; y un medio de cálculo para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica de un feto mediante los valores de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una forma de realización, el aparato incluye además un medio para introducir al menos uno de los valores de ADAM12 y PP13 de una o varias muestras biológicas tomadas de la gestante; y la determinación del riesgo de una anomalía cromosómica de un feto mediante los valores de al menos uno de los valores de ADAM12 y PP 13, y los valores de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre. En una forma de realización, el aparato determina además el riesgo de padecer preeclampsia, e incluye un medio de entrada de datos para introducir una tensión arterial de la gestante; y un medio de cálculo para determinar el riesgo de preeclampsia mediante los valores de entrada de uno o varios de PIGF y PAPP-A y la tensión arterial. Puede incluirse un medio de datos adicional para introducir marcadores biofísicos, como marcadores ecográficos, incluidos los valores de TN, e información de la historia materna, junto con un medio de cálculo correspondiente para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica del feto y/o de preeclampsia.

Asimismo, la presente divulgación proporciona paquetes comerciales o kits para determinar el riesgo de que una gestante padezca preeclampsia. Dichos kits pueden incluir uno o varios reactivos para detectar el valor de al menos un marcador bioquímico de una muestra biológica de una gestante, donde el al menos un marcador bioquímico se selecciona entre PIGF y PAPP-A; y, de manera opcional, instrucciones para llevar a cabo la prueba. Asimismo, el kit puede incluir reactivos para detectar otros marcadores bioquímicos como PP13, MP3, TNFR1, ADAM12 y otros marcadores bioquímicos. Los kits específicos de ejemplo contienen reactivos para detectar PIGF y PAPP-A; PIGF y PP13; PAPP-A y PP13; PIGF, PAPP-A y PP13; y combinaciones con otros marcadores bioquímicos relevantes para la preeclampsia y trastornos relacionados.

Un kit para determinar el riesgo de que una gestante sea portadora de un feto con una anomalía cromosómica puede incluir reactivos para medir el valor de PIGF, PAPP-A, y beta hCG libre de una muestra biológica tomada de la gestante; y, de manera opcional, instrucciones para llevar a cabo la prueba.

Un reactivo para detectar el valor de un marcador bioquímico puede ser, por ejemplo, un ligando que reconoce de manera selectiva el marcador bioquímico concreto, como un anticuerpo, una porción de un anticuerpo, un material similar a un anticuerpo, ácido nucleico-proteína y similares.

Ejemplo comparativo 1. Estudio clínico de la función de PIGF, PAPP-A y marcadores biofísicos para detectar la preeclampsia

Este ejemplo muestra la utilidad de diversas combinaciones de marcadores bioquímicos y biofísicos, entre los que se incluye la tensión arterial materna, el índice de pulsatilidad Doppler uterino, PIGF, PAPP-A y PP 13, para determinar el riesgo de preeclampsia en una gestante.

Se inició un estudio para realizar una exploración de resultados adversos en el embarazo de mujeres que asistieron a una evaluación del riesgo habitual en busca de anomalías cromosómicas. Se registraron las características maternas y la historia clínica y se tomaron muestras de sangre. El suero se almacenó a -80 °C para un posterior análisis bioquímico. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de las mujeres que aceptaron participar en el estudio, que fue aprobado por el comité de ética del King's College Hospital. En el Ejemplo 3 se ofrece información adicional con respecto a la población clínica y a la recogida de muestras.

Para los análisis descritos en el presente documento, todos los marcadores bioquímicos y biofísicos se expresaron en MoM y log₁₀ transformado. La expresión de la tensión arterial (TAM) como un MoM es un enfoque único del presente estudio.

Los valores de marcadores bioquímicos y lecturas biofísicas se expresaron en forma de MoM como sigue, donde LCC es longitud céfalo-caudal, IMC es índice de masa corporal, EG es gestación en días y el peso materno está en kg:

$$\begin{aligned} & \text{PIGF}/(277,908-6,97605\text{EG}+0,0477151\text{EG}\times\text{EG}) \\ & \text{PP13}/70,15/(0,30974+45,3179/\text{peso}) \\ & \text{TAM (tensión arterial)}/10^{1,94359-0,00024649\text{LCC}/10-0,111838+0,00590207\text{IMC}-0,0000574110\text{IMC}\times\text{IMC}} \\ & \text{Doppler (IP)}/^{36683-0,00246\text{LCC}/10}0,02691-0,00105\text{IMC} \end{aligned}$$

Valores medios para PIGF, PP13, PAPP-A, TAM e IP Doppler, los valores fueron -0,200, -0,078, -0,268, 0,051 y 0,197 respectivamente en PE precoz; y -0,002, 0,002, 0,009, 0,000 y 0,000 en embarazos no afectados.

En el mismo orden, las desviaciones estándar (DE) fueron: 0,308, 0,200, 0,324, 0,047 y 0,137; y 0,185, 0,184, 0,236, 0,035 y 0,120.

Los valores de *r* fueron los siguientes: PE precoz: PIGF-PP13 0,194; PIGF-PAPP-A 0,365; PIGF-TAM -0,142; PIGF-Doppler 0,199; PP13-PAPP-A 0,389; PP13-TAM 0,065; PP13-Doppler-0,332; PAPP-A-TAM 0,364; PAPP-A-Doppler -0,295; TAM-Doppler -0,485.

No afectados: PIGF-PP13 0,046; PIGF-PAPPA 0,278; PIGF-TAM -0,043; PIGF-Doppler -0,066; PP13-PAPPA 0,271; PP13-TAM -0,014; PP13-Doppler -0,089; PAPPA-TAM 0,000; PAPPA-Doppler -0,168; TAM-Doppler -0,075.

5 Los marcadores bioquímicos considerados fueron PAPP-A, PIGF y PP13 (mediante el inmunoensayo DELFIA de PerkinElmer). Los parámetros no afectados para PAPP-A fueron de todo el conjunto de datos, incluyendo los embarazos que no se encontraban en la serie de casos y controles. Todos los parámetros para PIGF y PP13 fueron de la serie de casos y controles.

10 Los marcadores biofísicos considerados incluyen parámetros para TAM e IP Doppler uterino de todo el conjunto de datos, aunque no todas las mujeres contaban con ambas medidas. Se utilizaron coeficientes de correlación con los marcadores bioquímicos.

15 Para expresar factores de riesgo *a priori* para la preeclampsia, se derivaron 1 razones (RV) de todo el conjunto de datos. Los valores observados se muestran en la Tabla 1 y se comparan con aquellos observados en un estudio anterior del mismo centro. La distribución de los factores de riesgo no guardaba relación con la gravedad de la preeclampsia (Tabla 2) de modo que se pueden utilizar las mismas RV para todos los subgrupos.

20 Para las predicciones basadas en modelos para marcadores bioquímicos y físicos, se presupusieron ajustes log-gaussianos multivariable. La Tabla 3 muestra la tasa de detección (TD) prevista para la preeclampsia precoz (parto <34 semanas) con una tasa de falsos positivos del 1 %, 5 % y 10 % para diversas combinaciones. La TD fue mayor para PIGF y PAPP-A que para cada uno por separado. De manera similar, la TD fue mayor para TAM e IP que para cada uno por separado. Las combinaciones de marcadores bioquímicos y biofísicos aumentaron la detección en mayor medida.

25 Para la distribución directa del riesgo observado, se calculó la proporción de casos de preeclampsia precoz con un riesgo estimado de preeclampsia precoz por encima del centil 99, 95 y 90 en la población adecuada (todos los embarazos no afectados o solamente controles). La Tabla 4 muestra las proporciones de riesgos calculadas a partir de distintas combinaciones de marcadores bioquímicos y biofísicos, sin considerar el riesgo *a priori*. Los resultados de los marcadores bioquímicos solos resultan menos predictivos que las predicciones basadas en modelos. Para los marcadores biofísicos solos y en combinación con marcadores bioquímicos, los resultados fueron acordes con las predicciones.

35 La Tabla 5 muestra las proporciones de casos de preeclampsia con resultados de alto riesgo en función solo de factores de riesgo *a priori*. La Tabla 6 muestra las proporciones con alto riesgo de preeclampsia precoz en función de factores de riesgo *a priori*, así como el perfil de marcadores bioquímicos y físicos. La Tabla 7 muestra la proporción de casos de preeclampsia tardía con un alto riesgo de resultado tardío; solo se muestran combinaciones seleccionadas.

40 Para resumir determinados aspectos, el riesgo inicial de preeclampsia para la gestante es la incidencia de la preeclampsia en la población sometida a exploración (por ejemplo, la incidencia de la preeclampsia en mujeres embarazadas de la misma etnicidad que la de la gestante).

45 En determinados casos, el MoM de PIGF y/o el valor de la mediana de PIGF obtenido de un grupo de mujeres embarazadas con embarazos no afectados se corrige según la edad gestacional del feto mediante la siguiente fórmula: PIGF corregido según la edad gestacional (EG) = $277,908 - 6,97605 * EG + 0,0477151 * EG * EG$, donde EG=edad gestacional en días. En determinados casos, el valor medido en MoM de PAPP-A y/o el valor de la mediana de PAPP-A obtenido de un grupo de mujeres embarazadas con embarazos no afectados se corrige según el peso materno de la gestante mediante la siguiente fórmula: PAPP-A corregida según el peso materno (P)= $-0,03239 + 69,3975/P$, donde P = peso de la mujer embarazada en kilogramos.

50 Asimismo, se examinaron marcadores biofísicos. A un total de 7658 mujeres con embarazos no afectados se les practicó una medición del IP Doppler uterino y 6584 tenían tensiones arteriales medias (TAM). El IP aumentó de manera constante con la gestación y la TAM disminuyó ligeramente, si bien alcanzó significación estadística. Tras expresar los valores en MoM, el IP se redujo ligeramente con un aumento de peso mientras que la TAM aumentó de manera notable. Ambos efectos fueron más fuertes cuando se utilizó el IMC en lugar del peso, aunque no considerablemente.

60 La mediana de IP y TAM aumentaron en la preeclampsia (Tablas 21 y 22). Mientras que el aumento de la mediana en la TAM no fue muy grande, la desviación estándar fue mucho menor que la del IP (valores \log_{10} en embarazos no afectados 0,035 y 0,12 respectivamente) y los efectos fueron similares.

65 Con la presuposición del ajuste gaussiano multivariable y la utilización de los parámetros observados para embarazos con preeclampsia precoz y embarazos no afectados, se calcularon tasas de detección según predicción basada en modelos para tasas de falsos positivos fijas. Asimismo, se calcularon los riesgos para cada caso y control con el objetivo de calcular directamente las tasas de detección y de falsos positivos. Se calcularon las tasas para diversas combinaciones de los marcadores bioquímicos, marcadores biofísicos y factores de riesgo.

5 Por consiguiente, este ejemplo muestra que a la hora de realizar una exploración de preeclampsia, hubo contribuciones independientes significativas de factores maternos, tensión arterial (TAM), PIGF y PAPP-A de la sangre materna. Se calculó una exploración por medio de una combinación de PIGF y/o PAPP-A con TAM para identificar aproximadamente el 70 % de pacientes que padecen preeclampsia precoz con una tasa de falsos positivos del 10 %. Se calculó una adición del IP de la arteria uterina a la exploración para identificar más del 90 % de las pacientes que padecen preeclampsia precoz con una tasa de falsos positivos del 10 %. Se calculó una exploración por medio de una combinación de PIGF, PAPP-A y TAM para identificar aproximadamente el 60 % de pacientes que padecen preeclampsia tardía con una tasa de falsos positivos del 10 %.

10

Tabla 1. Comparación de RV actuales con las de Papageorghiu *et al.*

Factor	Valor	Actual	Papageorghiu
Raza	Negra	2,18	1,45
		0,57	0,90
Fumadora	Sí	0,56	0,51
	No	1,04	1,10
Paridad	0	1,34	1,23
	1	0,66	0,72
	2	0,63	1,72
	3+	1,14	2,07
IMC	<25	0,65	0,82
	25-34	1,23	1,08
	35+	3,05	2,18
Hipertensa	Sí	10,24	12,52
	No	0,94	0,95
Historia de PE (paridad 1+)	Sí	7,87	3,19
	No	0,64	0,81
PE* en madre/hermana	Sí	2,89	2,49
	No	0,92	0,97

Actual=madre; Papageorghiu=hermana

Tabla 2. Distribución de los factores de riesgo, según la gestación en el parto

Factor	Valor	<34 semanas	34-6 semanas	37+ semanas
Raza	Negra	38 %	45 %	42 %
	Otra	62 %	55 %	58 %
Fumadora	Sí	0,0 %	9,1 %	5,2 %
	No	100 %	91 %	95%
Paridad	0	52 %	59 %	66 %
	1	24 %	32 %	21 %
	2	10 %	5 %	8 %
	3+	14 %	5 %	5 %

Factor	Valor	<34 semanas	34-6 semanas	37+ semanas
IMC	<25	38 %	32 %	36 %
	25-34	59 %	55 %	44 %
	35+	3 %	14 %	19 %
Hipertensa	Sí	14 %	9 %	3 %
	No	86 %	91 %	97 %
Historia de PE (paridad 1+)	Sí	50 %	67 %	65 %
	No	50 %	33 %	35 %
PE* en madre/hermana	Sí	10 %	18 %	10 %
	No	90 %	82 %	90 %

*Actual=madre; Papageorghiou=hermana

Tabla 3. Preeclampsia precoz: tasas de detección según predicción basada en modelos para TFP fijas

Combinación	1 % TFP	5 % TFP	10 % TFP
PIGF	23 %	37 %	46 %
PAPP-A	19 %	36 %	46 %
PP13	4 %	13 %	22 %
TAM	26 %	44 %	55 %
IP	28 %	50 %	62 %
PIGF y PAPP-A (doble)	30 %	47 %	57 %
PIGF, PAPP-A y PP13 (triple)	30 %	48 %	57 %
TAM e IP	51 %	77 %	87 %
PIGF y TAM	38 %	56 %	66 %
PAPP-A y TAM	38 %	63 %	74 %
Doble y TAM	45 %	67 %	77 %
Triple y TAM	46 %	67 %	77 %
PIGF, TAM e IP	61 %	84 %	91 %
PAPP-A, TAM e IP	60 %	84 %	91 %
Doble, TAM e IP	67 %	87 %	93 %
Triple, TAM e IP	67 %	87 %	94 %

Tabla 4. Riesgo de preeclampsia precoz (sin factores *a priori*): proporción de casos por encima de los centiles normales fijos

5

Combinación	99	95	90
PIGF	10 %	31 %	41 %
PAPP-A	21 %	24 %	41 %
PP13	3 %	17 %	17 %
TAM	28 %	44 %	56 %
IP	14 %	52 %	69 %
PIGF y PAPP-A (doble)	17 %	38 %	48 %
PIGF, PAPP-A y PP13 (triple)	17 %	41 %	48 %
TAM e IP	28 %	84 %	88 %
PIGF y TAM	44 %	48 %	68 %

PAPP-A y TAM	44 %	56 %	68 %
Doble y TAM	48 %	56 %	64 %
Triple y TAM	48 %	56 %	68 %
PIGF, TAM e IP	52 %	76 %	92 %
PAPP-A, TAM e IP	36 %	80 %	92 %
Doble, TAM e IP	56 %	72 %	96 %
Triple, TAM e IP	52 %	80 %	96 %

Tabla 5. Riesgo de preeclampsia precoz (solo factores *a priori*): proporción de casos por encima de los centiles normales fijos

Tipo de preeclampsia	99	95	90
Precoz	21 %	41 %	59 %
Otra	10 %	32 %	57 %
Todos	12 %	34 %	57 %

5 Tabla 6. Riesgo de preeclampsia precoz (con factores *a priori*): proporción de casos precoces por encima de los centiles normales fijos

Combinación	99	95	90
PIGF	28 %	45 %	62 %
PAPP-A	34 %	52 %	62 %
PP13	24 %	41 %	45 %
TAM	36 %	48 %	68 %
IP	24 %	66 %	72 %
Doble	24 %	59 %	66 %
Triple	31 %	59 %	69 %
TAM e IP	44 %	76 %	88 %
PIGF y TAM	40 %	64 %	68 %
PAPP-A & TAM	40 %	60 %	76 %
Doble y TAM	48 %	68 %	72 %
Triple y TAM	48 %	68 %	72 %
PIGF, TAM e IP	56 %	80 %	92 %
PAPP-A, TAM e IP	52 %	84 %	92 %
Doble, TAM e IP	60 %	88 %	96 %
Triple, TAM e IP	60 %	88 %	96 %

Tabla 7. Riesgo de preeclampsia tardía (con factores *a priori*): proporción de casos tardíos por encima de los centiles normales fijos

Combinación	99	95	90
PIGF	7 %	31 %	45 %
PAPP-A	6 %	27 %	42 %
TAM	18 %	37 %	56 %
IP	6 %	32 %	44 %
Doble	9 %	30 %	42 %
TAM e IP	19 %	40 %	57 %
Doble y TAM	17 %	34 %	58 %
Doble, TAM e IP	19 %	43 %	52 %

Tabla 21. Mediana MoM (#) para cada marcador biofísico según los resultados

Marcador	Controles	RCF	PET	HIE	Pretérmino
IP	1,00 (7658)	1,08 (296)	1,31 (128)	1,07 (89)	1,06 (58)
TAM	1,00 (6584)	1,14 (296)	11,09 (120)	1,18 (82)	1,12 (56)

Tabla 22. Preeclampsia: Mediana MoM, según la gestación en el parto

Marcador	<34 semanas #=25	34-36 #=21	37+ #=74
IP	1,58	1,48	1,12
TAM	1,12	1,11	1,08

5

Tabla 23. Correlaciones con IP

Marcador	Preeclampsia	No afectado
PIGF	-0,25**	-0,07
PP13 (Delfia)	-0,41**	-0,09*
PAPP-A	-0,28**	-0,17**
TAM	-0,12	-0,08**
*significativo; **muy significativo		

Tabla 24. Correlaciones con TAM

Marcador	Preeclampsia	No afectado
PIGF	0,06	-0,04
PP 13 (Delfia)	0,06	-0,01
PAPP-A	0,07	0,00
*significativo; **muy significativo		

10

Ejemplo comparativo 2: estudio clínico de la función de múltiples marcadores bioquímicos y biofísicos para detectar la preeclampsia y trastornos placentarios relacionados

15

Este ejemplo muestra la utilidad de diversas combinaciones de marcadores bioquímicos para determinar un riesgo de preeclampsia y trastornos relacionados en una gestante. En concreto, se encontró que los marcadores bioquímicos MMP3, PIGF, TNFR1 y PP13 (formato de ensayo DELFIA de PerkinElmer) eran significativos desde el punto de vista estadístico para predecir la preeclampsia y trastornos relacionados. Uno o varios de los marcadores que se demostró que tenían poder de predicción para detectar la preeclampsia pueden utilizarse en combinación con los conjuntos de marcadores descritos en el presente documento, como PIGF y/o PAPP-A y TAM.

20

Se inició un estudio para realizar una exploración de resultados adversos en el embarazo de mujeres que asistieron a una evaluación del riesgo habitual en busca de anomalías cromosómicas. Se registraron las características maternas y la historia clínica y se tomaron muestras de sangre. El suero se almacenó a -80 °C para un posterior análisis bioquímico. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de las mujeres que aceptaron participar en el estudio, que fue aprobado por el comité de ética del King's College Hospital. En el Ejemplo 3 se ofrece información adicional con respecto a la población clínica y a la recogida de muestras.

25

En primer lugar, se identificaron parámetros que afectan a los valores de marcadores bioquímicos en una muestra biológica materna. Se observó que (1) PIGF y ADAM12 aumentaron de manera abrupta con la gestación. Ninguno de los otros marcadores se asoció de manera significativa desde el punto de vista estadístico a la gestación, y la mediana total se utilizó para calcular los MoM; (2) Los MoM del TNFR1 aumentan con el peso; (3) PP13 y ADAM12 disminuyeron con el peso; (4) MMP3 y PIGF no guardaban relación con el peso. Se utilizaron ecuaciones de regresión inversa del peso para el ajuste; el IMC no fue un covariable mejor que el peso.

30

Para la detección de pacientes con preeclampsia, los resultados fueron significativos desde el punto de vista estadístico (bilateral) para MMP3 ($P < 0,005$), PIGF ($P < 0,0001$), TNFR1 ($P < 0,05$) y PP13 Delfia ($P < 0,02$). La Tabla 8 muestra valores de la mediana MoM para embarazos no afectados (Control), embarazos con restricción del crecimiento fetal (RCF), preeclámpticos (PET), con hipertensión inducida en el embarazo (HIE) y embarazos con parto prematuro. La Tabla 9 muestra los MoM de los centiles 10 y 90 en los controles, y las desviaciones estándar. Los datos muestran que TNFR1 tenía una distribución normal muy ajustada. Para PP13, de acuerdo con los datos recopilados hasta el momento, el inmunoensayo ELISA tenía más del doble de DE que el inmunoensayo DELFIA.

40

La Figura 4 muestra los MoM emparejados de PP13 Delfia y ELISA para embarazos con preeclampsia y no afectados. Ello demuestra que el inmunoensayo DELFIA de PerkinElmer presentaba una desviación menor en

relación con la tecnología ELISA empleada en este experimento.

Se encontró que el PIGF era el marcador bioquímico más fuerte del grupo de preeclampsia de <34 semanas, seguido por la PP 13 (Preeclampsia: mediana MoM según la gravedad (Tabla 10)). Estos y otros marcadores bioquímicos también resultaron de utilidad para detectar la preeclampsia entre el grupo de las 34-36 semanas y el grupo de las 37+ semanas.

Se examinó el efecto de la etnicidad sobre los MoM de los marcadores bioquímicos (véase Tabla 11). Los resultados demostraron que existía un fuerte efecto de la etnicidad sobre MMP3, PIGF y posiblemente PP13 ELISA. Asimismo, se examinó el efecto del tabaco sobre los MoM de los marcadores bioquímicos (véase Tabla 12). Los resultados demostraron un efecto del tabaco sobre PIGF, PP13 y ADAM12. Asimismo, se examinó el efecto de la paridad y la edad materna. Ninguno de los marcadores bioquímicos estaba notablemente relacionado con la paridad o la edad materna, aunque parecía que había un pequeño aumento constante en PP13. Hubo únicamente 16 embarazos mediante TRA pero cabe destacar que la mediana para el PIGF fue de 0,87 MoM. La Tabla 13 muestra los centiles pertinentes para embarazos no afectados. La Tabla 14 muestra centiles en casos de preeclampsia precoz. El PIGF fue el mejor predictor en el percentil 10, seguido por PP13. La Tabla 15 muestra centiles en casos preeclámpticos con el parto a las 34-36 semanas. No hubo una correlación importante entre PIGF y PP 13 (mediante un inmunoensayo DELFIA de PerkinElmer) en embarazos no afectados (Tabla 16), pero parece existir una pequeña correlación en la preeclampsia (Tabla 17). La Figura 5 muestra los MoM emparejados para los 29 casos de preeclampsia precoz.

El valor de la mediana (\log_{10} DE) de PAPP-A en embarazos con preeclampsia y embarazos de control no afectados fue de 0,79 MoM (0,22) y de 1,08 MoM (0,22), respectivamente. Asimismo, hubo una alta correlación tanto con PIGF como con PP13 (Tabla 18). El alcance de la reducción de PAPP-A fue mayor en los embarazos con preeclampsia precoz, con una mediana MoM de 0,54 MoM. La beta hCG libre no fue un marcador de preeclampsia (medianas 1,16 y 1,10 en embarazos con preeclampsia y no afectados) y muestra una correlación más débil con PIGF y PP13 (Tabla 19). Los valores de marcadores de exploración de la mediana (\log_{10} DE) de toda la serie de 7413 embarazos no afectados, no solo controles, fue de 1,02 MoM (0,24) para PAPP-A y de 1,09 MoM (0,26) para beta hCG libre.

Las reducciones en valores de la mediana de PP13 ELISA, PP13 Delfia y ADAM12 (véase Tabla 8) fueron significativas desde el punto de vista estadístico (todos $P < 0,0001$). Hubo una tasa relativamente alta de fumadoras en el grupo de restricción del crecimiento, pero el efecto seguía siendo evidente tras la estratificación (véase, por ejemplo, la Tabla 20 en comparación con la Tabla 12). El valor de la mediana de PAPP-A también se redujo (0,80 MoM).

Por consiguiente, este ejemplo muestra que, en la detección de la preeclampsia, PIGF, PP13, TNFR1 fueron los marcadores más eficaces; en la detección de la restricción del crecimiento fetal, PIGF, PP 13, ADAM 12 y MMP3 fueron los marcadores más eficaces; en la detección de la hipertensión inducida en el embarazo (también denominada hipertensión gestacional), PP13, PIGF y MMP3 fueron los marcadores más eficaces; y en la detección del parto prematuro, PP 13, PIGF y MMP3 fueron los marcadores más eficaces. Asimismo, se muestra que PIGF, PP 13 y otros marcadores resultan de utilidad para detectar la preeclampsia a lo largo del embarazo, lo que incluye las <34 semanas (inclusive) y posteriormente.

Tabla 8. Mediana MoM (#) para cada marcador bioquímico según los resultados

Marcador	Controles	RCF	PET	HIE	Pretérmino
MMP3	1,00 (572)	1,07 (296)	1,17 (128)	1,10 (88)	1,18 (57)
PIGF	1,00 (571)	0,96 (296)	0,84 (127)	0,89 (88)	1,10 (57)
TNFR1	0,99 (572)	1,01 (296)	1,06 (128)	1,01 (88)	1,04 (57)
PP13 (ELISA)	1,00 (312)	0,68 (170)	0,97 (77)	0,70 (48)	0,90 (21)
PP13 (Delfia)	1,00 (570)	0,80 (296)	0,87 (128)	0,92 (88)	0,83 (58)
ADAM12	0,99 (572)	0,84 (296)	0,98 (128)	0,99 (88)	1,02 (58)

Tabla 9. MoM de los centiles 10 y 90 en controles, y DE, presuponiendo el ajuste \log_{10} gaussiano

Marcador	Centil 10	Centil 90	DE
MMP3	0,55	1,82	0,20
PIGF	0,62	1,86	0,19
TNFR1	0,78	1,26	0,08
PP13 (ELISA)	0,23	2,74	0,42
PP13 (Delfia)	0,58	1,71	0,18
ADAM12	0,68	1,42	0,12

Tabla 10. Preeclampsia: mediana MoM, según la gestación en el parto

Marcador	< 34 semanas # =29	34-36 semanas # =22	37+ semanas # =77
MMP3	1,12	1,21	1,16
PIGF	0,63	0,74**	0,95
TNFR1	1,09	1,07	1,03
PP13 (ELISA)*	1,02	0,55	1,05
PP13 (Delfia)	0,84	0,70	0,91
ADAM12	1,07	0,84	0,99

*#=24, 12 y 41; **#=21

Tabla 11. Embarazos no afectados: mediana MoM según la etnicidad; proporciones entre paréntesis

Marcador	Caucásica (72 %)	Afroamericana (17 %)	India (5 %)	China (2 %)	Mixta (4 %)	No caucásica
MMP3	1,03	0,86	0,81	1,06	1,06	0,91
PIGF	0,94	1,43	1,18	0,98	1,06	1,27
TNFR1	1,00	0,95	0,93	1,01	1,08	0,97
PP13 (ELISA)	0,92	1,24	0,79	1,11	1,19	1,15
PP13 (Delfia)	0,99	1,09	1,05	0,95	0,96	1,05
ADAM12	0,97	1,09	0,92	1,10	1,05	1,05

Tabla 12. Embarazos no afectados: mediana MoM según la condición de fumadora; proporciones entre paréntesis

Marcador	No fumadora (96 %)	Fumadora (4 %)
MMP3	0,99	1,04
PIGF	0,98	1,33
TNFR1	0,99	1,08
PP13 ELISA	1,03	0,41
PP13 Delfia	1,02	0,54
ADAM12	1,01	0,82

5

Tabla 13. Embarazos no afectados: centiles seleccionados (MoM)

Marcador	<1	<5	<10	>90	>95	>99
MMP3	0,29	0,45	0,55	1,82	2,30	3,25
Caucásica	0,26	0,48	0,56	1,99	2,59	3,36
No caucásica	0,31	0,41	0,48	1,71	1,84	2,38
PIGF	0,39	0,50	0,62	1,86	2,19	3,78
No fumadora	0,40	0,50	0,62	1,84	2,15	3,68
Fumadora	0,71	0,78	0,88	2,64	2,76	4,49
Caucásica	0,39	0,50	0,61	1,57	1,88	2,64
No caucásica	0,42	0,54	0,71	2,33	2,75	4,51
TNFR1	0,63	0,70	0,78	1,26	1,34	1,60
PP13 (ELISA)	0,02	0,04	0,22	2,66	4,10	7,92
No fumadora	0,02	0,10	0,25	2,56	3,87	7,76
PP13 (Delfia)	0,40	0,49	0,58	1,72	2,02	2,75
No fumadora	0,41	0,54	0,60	1,72	2,02	2,62
Fumadora	0,24	0,30	0,32	0,96	1,13	1,15
ADAM12	0,43	0,58	0,67	1,41	1,56	2,00
No fumadora	0,45	0,57	0,68	1,42	1,57	1,92
Fumadora	0,63	0,64	0,65	1,29	1,34	1,98

Tabla 14. Preeclampsia precoz: casos en relación con centiles seleccionados

Marcador	#	<1	<5	<10	>90	>95	>99
MMP3	29	1	1	2	4	0	0
PIGF	29	7	10	15	1	0	0
TNFR1	29	1	2	5	5	3	0
PP13 ELISA	24	2	3	5	4	3	1
PP13 Delfia	29	5	5	7	1	1	0
ADAM12	29	2	2	6	2	0	0

Tabla 15. Preeclampsia con parto a las 34-36 semanas: casos en relación con centiles seleccionados

Marcador	#	<1	<5	<10	>90	>95	>99
MMP3	22	0	1	2	4	3	1
PIGF	21	3	5	7	1	0	0
TNFR1	22	1	1	3	5	4	0
PP13 (ELISA)	12	2	3	3	0	0	0
PP13 (Delfia)	22	2	3	8	0	0	0
ADAM12	22	1	4	5	1	1	0

5

Tabla 16. Correlaciones en embarazos no afectados (excluyendo valores atípicos)

Marcador	MMP3	PIGF	TNFR1	PP13ELISA	PP13Delfia
PIGF	0,02	-			
TNFR1	0,47**	0,09*	-		
PP13 (ELISA)	-0,14*	0,03	-0,06	-	
PP13 (Delfia)	-0,15**	0,05	0,03	0,56**	-
ADAM12	-0,08	0,27**	-0,03	0,31**	0,38**

*significativo; **muy significativo

Tabla 17. Correlaciones en preeclampsia (excluyendo valores atípicos)

Marcador	MMP3	PIGF	TNFR1	PP13 (ELISA)	PP13 (Delfia)
PIGF	-0,01	-			
TNFR1	0,51**	0,04	-		
PP13 (ELISA)	0,15	0,13	-0,10	-	
PP13 (Delfia)	-0,02	0,24*	-0,06	0,48**	-
ADAM12	-0,04	0,16	-0,25*	0,44**	0,43**

Tabla 18. Correlaciones con PAPP-A (excluyendo valores atípicos)

Marcador	Preeclampsia	No afectados
MMP3	0,12	-0,07
PIGF	0,34**	0,27**
TNFR1	-0,02	-0,04
PP13 (ELISA)	0,11	0,20**
PP13 (Delfia)	0,38**	0,27**
ADAM12	0,49**	0,42**

*significativo; **muy significativo

10

Tabla 19. Correlaciones con beta hCG libre (excluyendo valores atípicos)

Marcador	Preeclampsia	No afectados
MMP3	0,02	-0,06
PIGF	0,08	0,18**
TNFR1	0,05	0,10*
PP13 (ELISA)	0,26**	0,15*
PP 13 (Delfia)	0,40**	0,32**

ADAM12	0,26**	0,21**
*significativo; **muy significativo		

Tabla 20. Restricción del crecimiento fetal: mediana MoM, según la condición de fumadora; proporciones entre paréntesis

Marcador	No fumadora (82 %)	Fumadora (18 %)
MMP3	1,04	1,24
PIGF	0,90	1,16
TNFR1	1,01	1,13
PP13 ELISA	0,79	0,13
PP13 Delfia	0,86	0,52
ADAM12	0,88	0,71

5 **Ejemplo comparativo 3.:** estudio clínico de la función de marcadores bioquímicos y marcadores biofísicos Doppler para detectar trastornos hipertensos maternos

Este ejemplo muestra la utilidad de diversas combinaciones de marcadores bioquímicos y biofísicos, que incluyen PIGF, PAPP-A, IP de la arteria uterina, para determinar el riesgo de que una gestante sea portadora de un feto que presenta una anomalía cromosómica.

Se inició un estudio para realizar una exploración de resultados adversos en el embarazo de mujeres que asistieron a una evaluación del riesgo habitual en busca de anomalías cromosómicas al medir el grosor de la translucencia nucal del feto y la PAPP-A y beta hCG libre en suero materno a las 11⁺⁰-13⁺⁶ semanas de gestación. Se registraron las características maternas y la historia clínica, se midió el IP de la arteria uterina mediante un Doppler color transabdominal y se almacenó el suero a -80 °C para un posterior análisis bioquímico. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de las mujeres que aceptaron participar en el estudio, que fue aprobado por el comité de ética del King's College Hospital.

20 La población del estudio de casos y controles se comprendió de 127 embarazos que posteriormente presentaron PE, incluyendo 29 que precisaron el parto antes de las 34 semanas y 98 con PE tardía, 88 con hipertensión gestacional (HG), 296 casos que tuvieron partos de recién nacidos pequeños para la edad gestacional (PEG), 57 casos con parto prematuro espontáneo antes de las 34 semanas y 41 casos de trisomía 21. Se emparejó cada caso con un caso de control del que se hubieran tomado y almacenado muestras de sangre el mismo día y que no padeciera ninguna complicación durante el embarazo y que diera lugar al nacimiento vivo de recién nacidos fenotípicamente normales.

30 A las pacientes se les pidió que rellenaran un cuestionario sobre la edad materna, origen racial (caucásico, afroamericano, indio, paquistaní, chino o japonés y mezcla), consumo de tabaco durante el embarazo (sí o no), método de concepción (espontáneo, toma de inductores de la ovulación y fecundación *in vitro*), historia clínica (incluyendo hipertensión crónica, diabetes *mellitus*, síndrome antifosfolípido, trombofilia, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y anemia falciforme), medicamentos (incluyendo antihipertensivos, antidepresivos, antiepilépticos, antiinflamatorios, antitiroideos, aspirina, betamiméticos, insulina, esteroides, tiroxina), paridad (primípara/multipara o nulípara si no ha habido parto más allá de las 23 semanas), historia obstétrica (incluyendo un embarazo anterior con PE) e historia familiar de PE (madre). Se midieron el peso y la altura maternos y se calculó el índice de masa corporal (IMC) en kg/m².

40 Se utilizaron muestras de suero por duplicado de 100 µL para medir la concentración de PIGF por medio de una técnica cuantitativa de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) mediante el kit de inmunoensayo Quantikine® Human PIGF (R&D systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido). Los ensayos se realizaron en un procesador automático de ELISA (BEP 2000 de Dade-Behring, Liederbach, Alemania). Las lecturas de absorbancia se tomaron en un lector de placas VICTOR™ (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finlandia) y las concentraciones de PIGF se determinaron mediante el *software* MultiCalc (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finlandia). El límite inferior de detección del ensayo fue de 7 pg/ml y la imprecisión entre lotes fue de 8,3 % en una concentración de PIGF de 48 pg/ml, de 5,6 % en 342 pg/ml y de 5,1 % en 722 pg/ml. Se volvieron a analizar las muestras cuyo coeficiente de variación de los duplicados sobrepasó el 15 %.

50 La concentración medida de PIGF se transformó en log para hacer la distribución gaussiana. A continuación, se utilizó un análisis de regresión múltiple para determinar qué factores entre las características maternas y la longitud céfalo-caudal (LCC) del feto eran predictores significativos de log PIGF en el grupo de control y, a partir del modelo de regresión, se expresó el valor en cada caso y control como un múltiplo de la mediana esperada del grupo de control (MoM). Se trazó un diagrama cajas y bigotes del MoM de PIGF de cada grupo de resultados. Se utilizó una prueba Mann-Whitney para determinar la significación de las diferencias en la mediana MoM de cada grupo de resultados con respecto a la de los controles.

55

En cada caso y control, la PAPP-A y el IP de la arteria uterina medidos se convirtieron a MoM tras ajustarlos para la gestación, edad materna, etnicidad, IMC o peso, paridad, historia anterior de PE y método de concepción (véase, por ejemplo, Kagen *et al.*, *Ultrasound Obstet Gynecol* 31:493-502 (2008)). A continuación, se utilizó un análisis de regresión para determinar la significación de la asociación entre log MoM de PIGF con log MoM de PAPP-A, log MoM de IP de la arteria uterina, percentil del peso al nacer y gestación en el parto de cada grupo de resultados.

Se utilizó un análisis de regresión logística para determinar qué factores entre las características maternas, el log MoM de PIGF, el log MoM de PAPP-A y el log MoM de IP de la arteria uterina contribuían de manera significativa en la predicción de la PE. El rendimiento de la exploración se determinó por medio de curvas de características operativas del receptor (ROC por sus siglas en inglés). Se utilizó el paquete de *software* estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) en todos los análisis de datos.

Las características maternas de cada uno de los grupos de resultados se comparan en la Tabla 30.

Un análisis de regresión múltiple del grupo de control demostró que, para el log PIGF, se ofrecieron contribuciones independientes significativas por medio del LCC del feto, el peso materno, el consumo de tabaco y el origen étnico: $\log \text{PIGF esperado} = 1,150 + 0,008 \times \text{LCC en mm} - 0,002 \times \text{peso en kg} + (0,199 \text{ si fumadora, } 0 \text{ si no}) + (0,177 \text{ si negra, } 0,100 \text{ si india o paquistaní, } 0 \text{ si de otros orígenes étnicos})$; $R^2=0,237$, $p<0,0001$. Esta fórmula se utilizó en cada paciente para derivar el log PIGF esperado y después se expresó el valor observado en forma de un MoM del valor esperado (Figura 1, Tabla 30).

Hubo una asociación significativa entre el log MoM de PIGF y el log MoM de PAPP-A ($r=0,264$, $p<0,0001$; Figura 2), el log MoM de IP de la arteria uterina ($r=0,102$, $p=0,012$; Figura 3), el percentil del peso al nacer ($r=0,114$, $p=0,005$), pero no con la edad gestacional en el parto ($p=0,960$).

Tanto en el grupo de PE precoz como en el de PE tardía, el PIGF y la PAPP-A eran menores y el IP de la arteria uterina era mayor que en los controles (Figura 1, Tabla 30). Hubo una asociación significativa entre el log MoM de PIGF y el log MoM de PAPP-A ($r=0,325$, $p<0,0001$; Figura 2), el log MoM de IP de la arteria uterina ($r=0,279$, $p=0,001$; Figura 3), la edad gestacional en el parto ($r=0,256$, $p=0,04$) y el percentil de peso al nacer ($r=0,338$, $p<0,0001$).

El análisis de regresión logística demostró que se ofrecieron significativas contribuciones a la detección de la PE precoz por parte de los factores maternos, el PIGF, la PAPP-A y el IP de la arteria uterina ($R^2=0,500$, $p<0,0001$, Tabla 31). El análisis de regresión logística demostró que se ofrecieron significativas contribuciones a la detección de la PE tardía por parte de los factores maternos, el PIGF y el IP de la arteria uterina, ($R^2=0,290$, $p<0,0001$; Tabla 3), pero no por parte de la PAPP-A ($p=0,933$).

En la Tabla 33 se proporcionan las tasas de detección de preeclampsia precoz y preeclampsia tardía para distintas tasas de falsos positivos en la exploración por medio de los factores maternos, el PIGF en suero, la PAPP-A en suero, el IP de la arteria uterina y sus combinaciones. Asimismo, el rendimiento de los distintos métodos de exploración se compara por medio de las áreas bajo las curvas ROC en la Tabla 33.

En el grupo de HG, en comparación con los controles, no hubo diferencias significativas en el PIGF, la PAPP-A o el IP de la arteria uterina (Figura 1, Tabla 31).

La concentración de PIGF en suero materno a las 11⁺⁰-13⁺⁶ semanas de gestación en embarazos normales aumentó con la LCC del feto y, por tanto, con la edad gestacional, disminuyó con el peso materno y era mayor en mujeres afroamericanas que en caucásicas y en fumadoras que en no fumadoras. En consecuencia, como en el caso de la PAPP-A, la concentración medida de PIGF se ajustó para dichas variables antes de comparar los resultados con embarazos patológicos. Al igual que con el PIGF, la concentración de PAPP-A en suero aumentó con la LCC del feto, disminuyó con el IMC materno y fue mayor en mujeres afroamericanas que en caucásicas. No obstante, en fumadoras se observó una clara disociación en la relación entre estos dos productos placentarios, con una disminución de la PAPP-A en suero y un aumento del PIGF.

En embarazos que presentan preeclampsia, la concentración de PIGF en suero materno a las 11⁺⁰-13⁺⁶ semanas de gestación fue menor que en embarazos normotensos. Asimismo, se observó una asociación significativa entre el PIGF y la gravedad de la PE, definida tanto por la gestación en la que se llevó a cabo el parto yatrógeno como por el centil del peso al nacer de los recién nacidos.

Por consiguiente, este ejemplo muestra que el PIGF, la PAPP-A y el IP, así como sus combinaciones, son marcadores eficaces en la detección de la preeclampsia precoz y, en menor medida, en la detección de la preeclampsia tardía.

Tabla 30. Características maternas en los cuatro grupos de resultados

Característica materna	Control (n=609)	Preeclampsia precoz (n=29)	Preeclampsia tardía (n=98)	Hipertensión gestacional (n=88)
Edad materna en años (mediana, rango)	32,7 (16-45)	32,7 (17-49)	31,5 (18-44)	33,3 (18-46)
Peso en kg (mediana, rango)	65,0 (42-143)	72,0 (54-105)*	69,5 (44-140)†	71,0 (50-147)‡
Longitud céfalo-caudal en mm (mediana, rango)	64,0 (45-84)	67,0 (52-84)	62,3 (46-84)*	62,5 (47-83)
Etnicidad				
Caucásica (n, %)	443 (72,7)	11 (37,9)†	41 (41,8)‡	67(76,1)
Afroamericana (n, %)	97 (15,9)	14 (48,3)‡	41 (41,8)‡	16 (18,2)
India o paquistaní (n, %)	34 (5,6)	2 (6,9)	7(7,1)	0*
China o japonesa (n, %)	13 (2,1)	0	2 (2,0)	1(1,1)
Mixta (n, %)	22 (3,6)	2 (6,9)	7(7,1)	4 (4,5)
Paridad				
Nulípara (n, %)	278 (45,6)	15(51,7)	64(65,3)‡	49 (55,7)
Primípara/múltipara: sin preeclampsia anterior (n, %)	315(51,7)	7 (24,1)*	23 (23,5)‡	29(33,0)†
Primípara/múltipara: preeclampsia anterior (n, %)	16 (2,6)	7(24,1)‡	11(11,2)†	10(11,4)†
Fumadora (n, %)	30 (4,9)	0	6 (6,1)	7(8,0)
Historia familiar de preeclampsia: madre (n, %)	22(3,6)	3(10,3)	12(12,2)†	9 (10,2)*
Concepción				
Espontánea (n, %)	594 (97,5)	25 (86,2)*	94 (95,9)	85 (96,6)
Inductores de la ovulación (n, %)	10(1,6)	3 (10,3)*	3(3,1)	0
Fecundación <i>in vitro</i> (n, %)	5(0,8)	1(3,4)	1(1,0)	3(3,4)
Historia clínica				
Ninguna (n, %)	599(98,4)	24(82,8)†	93(94,9)*	85(96,6)
Hipertensión crónica (n, %)	1(0,2)	4(13,8)‡	4(4,1)*	0
Diabetes <i>mellitus</i> (n, %)	4(0,7)	0	0	2(2,3)
Síndrome antifosfolípido (n, %)	3(0,5)	0	1 (1,0)	1(1,1)
Trombofilia (n, %)	0	1 (3,4)*	0	0
Anemia falciforme (n, %)	1(0,2)	0	0	0
Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (n, %)	1(0,2)	0	0	0
Medicamentos durante el embarazo				
Ninguno (n, %)	572(93,9)	25(86,2)	90(91,8)	76(86,4)*
Antihipertensivos (n, %)	0	2(6,9)*	2(2,0)*	0
Insulina (n, %)	3(0,5)	0	0	2(2,3)
Esteroides (n, %)	1(0,2)	0	0	0
Betamiméticos (n, %)	5(0,8)	0	3(3,1)	1(1,1)
Combinación de medicamentos para el asma (n, %)	6(1,0)	0	1(1,0)	3(3,4)
Tiroxina (n, %)	9(1,5)	1(3,4)	1(1,0)	2(2,3)
Aspirina (n, %)	3(0,5)	0	0	2(2,3)
Antiepilépticos (n, %)	2(0,3)	0	0	1(1,1)
Litio (n, %)	6(1,0)	1(3,4)	0	1(1,1)
Antiinflamatorios (n, %)	2(0,3)	0	1(1,0)	0

Comparación con grupo no afectado (test chi-cuadrado para variables categóricas y análisis de varianza para variables continuas): * P < 0,05, † P < 0,01, ‡ P < 0,0001

Tabla 31. Mediana (amplitud intercuartilo) MoM del factor de crecimiento placentario (PIGF) en suero materno, MoM de PAPP-A y MoM de índice de pulsatilidad (IP) de la arteria uterina de los cuatros grupos de resultados: de control, de preeclampsia precoz, de preeclampsia tardía y de hipertensión gestacional

Grupo de resultados	MoM de PIGF	MoM de PAPP-A	MoM de IP de arteria uterina
Control	0,991 (0,799-1,286)	1,070 (0,735-1,455)	1,030 (0,839-1,242)
Preeclampsia precoz	0,611 (0,480-0,839) [‡]	0,535 (0,391-0,961) [‡]	1,512 (1,204-1,653) [‡]
Preeclampsia tardía	0,822 (0,550-1,056) [‡]	0,929 (0,574-1,310) [*]	1,220 (0,927-1,448) [‡]
Hipertensión gestacional	0,966 (0,712-1,246)	0,895 (0,622-1,442)	1,100 (0,885-1,287)

Prueba Mann-Whitney para comparar cada grupo con controles: * $P < 0,05$, † $P < 0,01$, ‡ $P < 0,0001$

5 Tabla 32. Análisis de regresión logística para la predicción de preeclampsia (PE) precoz y tardía

Variable independiente	Preeclampsia precoz				Preeclampsia tardía			
	OR	95 % IC	P	OR	95 % IC	P	OR	95 % IC
Log MoM de PIGF	0,01	0,00	0,17	0,002	0,09	0,03	0,32	<0,0001
Log MoM de IP de arteria uterina	2020561	5358,56	7,6E+08	<0,0001	14,03	1,89	103,9 1	0,010
Log MoM de PAPP-A	0,16	0,03	0,97	0,046	-	-	-	-
Índice de masa corporal en kg/m ²	-	-	-	-	1,11	1,07	1,16	<0,0001
Hipertensión crónica	237,694	17,33	3260,52	<0,0001	-	-	-	-
Raza negra	3,17	1,17	8,56	0,023	3,92	2,27	6,78	<0,0001
India o paquistaní	-	-	-	-	2,95	1,16	7,55	0,024
Raza mixta	-	-	-	-	4,71	1,74	12,75	0,002
Primípara/múltipara: sin PE anterior	-	-	-	-	0,28	0,16	0,48	<0,0001
Historia familiar de PE	-	-	-	-	4,22	1,71	10,41	0,002

Tabla 33. Comparación del rendimiento de la exploración de preeclampsia por medio de los factores maternos, el factor de crecimiento placentario (PIGF), la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), el índice de pulsatilidad (IP) de la arteria uterina y sus combinaciones

Prueba de exploración	Área bajo la curva ROC			
	Preeclampsia precoz		Preeclampsia tardía	
Historia, media (95 % IC)	0,762 (0,654-0,870)		0,788 (0,742-0,834)	
PIGF, media (95 % IC)	0,797 (0,705-0,888)		0,652 (0,589-0,714)	
PAPP-A, media (95 % IC)	0,742 (0,639-0,846)		0,576 (0,513-0,639)	
IP de arteria uterina, media (95 % IC)	0,826 (0,740-0,912)		0,626 (0,560-0,692)	
Historia con PIGF, media (95 % IC)	0,881 (0,817-0,944)		0,817 (0,775-0,859)	
Historia con PAPP-A, media (95 % IC)	0,842 (0,747-0,937)		0,788 (0,741-0,834)	
Historia con IP de arteria uterina, media (95 % IC)	0,902 (0,833-0,971)		0,801 (0,753-0,849)	
Historia con PIGF e IP de arteria uterina, media (95 % IC)	0,941 (0,889-0,994)		0,817 (0,773-0,861)	
Historia con PIGF, PAPP-A e IP de arteria uterina, media (95 % IC)	0,936 (0,882-0,989)		-	

	Tasa de detección (%) para la tasa fija de falsos positivos			
	5 %	10 %	5 %	10 %
Historia, %	39,0	49,0	29,6	43,9
PIGF, %	27,6	51,7	19,4	32,7
PAPP-A, %	24,1	41,4	8,2	18,4
IP de arteria uterina, %	37,9	65,5	16,3	27,6
Historia con PIGF, %	55,2	62,1	28,6	52,0
Historia con PAPP-A, %	51,7	69,0	29,6	46,9

	Tasa de detección (%) para la tasa fija de falsos positivos			
	5 %	10 %	5 %	10 %
Historia con IP de arteria uterina, %	69,0	75,9	29,6	51,0
Historia con PIGF e IP de arteria uterina, %	75,9	89,7	29,6	49,0
Historia con PIGF, PAPP-A e IP de arteria uterina, %	75,9	86,2	-	-

Ejemplo 4. Estudio clínico de la función de marcadores bioquímicos y biofísicos maternos para detectar trastornos cromosómicos de un feto

5 Este ejemplo muestra la utilidad de diversas combinaciones de marcadores bioquímicos y biofísicos, entre los que se incluye PIGF, PAPP-A, beta hCG libre, y marcadores ecográficos, para determinar el riesgo de que una gestante sea portadora de un feto que presenta una anomalía cromosómica.

10 Se realizó una exploración de anomalías cromosómicas mediante una combinación de la edad materna, el grosor de la translucencia nucal (TN) fetal y la beta hCG libre y la PAPP-A en suero materno a las 11⁺⁰-13⁺⁶ semanas de gestación. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de las mujeres que aceptaron participar en el estudio para identificar posibles marcadores de complicaciones en el embarazo, que fue aprobado por el comité de ética del King's College Hospital.

15 Se realizó un examen por ecografía transabdominal para realizar una exploración de cualquier defecto fetal importante y para medir la TN y la longitud céfalo-caudal (LCC) fetales. Se utilizaron aparatos automáticos que ofrecen resultados reproducibles a los 30 minutos para medir la PAPP-A y la beta hCG libre (sistema DELFIA Xpress, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, EE. UU.). Se registraron las características demográficas maternas, las mediciones ecográficas y los resultados bioquímicos en una base de datos informatizada. Los resultados del cariotipo y la información sobre los resultados de los embarazos se incorporaron a la base de datos en cuanto estuvieron disponibles.

25 La población del estudio de casos y controles se comprendió de 175 casos con anomalías cromosómicas fetales y 609 controles sin complicaciones en el embarazo que dieron lugar al nacimiento vivo de recién nacidos fenotípicamente normales. Los casos y controles se emparejaron por el tiempo de almacenamiento de sus muestras biológicas.

30 Se utilizaron muestras de suero por duplicado de 100 µL para medir la concentración de PIGF por medio de una técnica cuantitativa de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) mediante el kit de inmunoensayo Quantikine® Human PIGF (R&D systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido). Los ensayos se realizaron en un procesador automático de ELISA (BEP 2000 de Dade-Behring, Liederbach, Alemania). Las lecturas de absorbancia se tomaron en un lector de placas VICTOR™ (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finlandia) y las concentraciones de PIGF se determinaron mediante el *software* MultiCalc (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finlandia). El límite inferior de detección del ensayo fue de 7 pg/ml y la imprecisión entre lotes fue de 8,3 % en una concentración de PIGF de 48 pg/ml, de 5,6 % en 342 pg/ml y de 5,1 % en 722 pg/ml. Se volvieron a analizar las muestras cuyo coeficiente de variación de los duplicados sobrepasó el 15 %.

40 En cada caso y control, la beta hCG, la PAPP-A y el PIGF medidos se convirtieron a MoM tras ajustarlos para la gestación, edad materna, etnicidad, peso, paridad y método de concepción. Se trazó un diagrama cajas y bigotes del MoM de PIGF de casos y controles. Se utilizó una prueba Mann-Whitney para determinar la significación de las diferencias en la mediana MoM entre cada grupo de anomalías cromosómicas y controles. A continuación, se utilizó un análisis de regresión para determinar la significación de la asociación entre el MoM de PIGF con el MoM de beta hCG libre y el MoM de PAPP-A. De manera similar, la TN medida se expresó como una diferencia de la media normal esperada para la gestación (valor delta) y a continuación se utilizó un análisis de regresión para determinar la significación de la asociación entre el MoM de PIGF y la TN delta.

50 El valor medido en MoM de PIGF, PAPP-A y/o beta hCG libre puede corregirse según la etnicidad al dividir el valor medido en MoM del marcador bioquímico (como, por ejemplo, PIGF, PAPP-A, o beta hCG libre) entre el respectivo valor de la mediana obtenido de un grupo de mujeres embarazadas con embarazos no afectados de la misma etnicidad de la mujer embarazada. Si se desea, el valor medido en MoM de PIGF, PAPP-A y/o beta hCG libre se corrige según el tabaco al dividir el valor medido en MoM del marcador bioquímico (como, por ejemplo, PIGF, PAPP-A o beta hCG libre) entre el respectivo valor de la mediana obtenido de un grupo de mujeres embarazadas con embarazos no afectados que fuman.

55

Se utilizó un análisis de regresión logística para determinar si se ofrecían contribuciones significativas a la detección de la trisomía 21 por parte de la edad materna, la beta hCG libre, la PAPP-A y el PIGF. El rendimiento de la exploración se determinó por medio de curvas de características operativas del receptor (ROC). Se utilizó el paquete de *software* estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) en todos los análisis de datos.

5 Hubo 90 embarazos simples con trisomía 21, 28 con trisomía 18, 19 con trisomía 13, 28 con síndrome de Turner y 10 con triploidía. Todos los 10 casos de triploidía presentaban el fenotipo de triploidía diginica, que se caracteriza por una placenta delgada, pero de apariencia normal con una restricción del crecimiento fetal asimétrica grave. Las características maternas de los casos y controles se comparan en la Tabla 35.

10 En el grupo euploide, la media de log MoM de PIGF fue de -0,004, con una desviación estándar (DE) de 0,171. Se observó una asociación significativa entre el log MoM de PIGF y el log MoM de PAPP-A ($r = 0,264$, $p < 0,0001$; Figura 7) y el log MoM de beta hCG libre ($r = 0,183$, $p < 0,0001$), pero no con la TN delta ($p = 0,054$).

15 En comparación con el grupo euploide, en embarazos con trisomía 21 las medianas de la beta hCG libre y la TN fetal fueron significativamente mayores y las de PAPP-A y PIGF fueron significativamente menores (Figura 8, Tabla 37). En embarazos con trisomía 21, la media de log MoM de PIGF fue de -0,150 con una DE de 0,181. Se observe una asociación significativa entre el log MoM de PIGF y el log MoM de PAPP-A ($r = 0,246$, $p = 0,020$; Figura 7), pero no con el log MoM de beta hCG libre ($p = 0,652$) ni la TN delta ($p = 0,055$). No se observó una asociación significativa entre el log MoM PIGF y la LCC fetal ($p = 0,973$).

20 El análisis de regresión logística demostró que se ofrecieron significativas contribuciones a la detección de la trisomía 21 por parte de la edad materna, la beta hCG libre, la PAPP-A y el PIGF ($R^2=0,662$; $p < 0,0001$; Tabla 38). En la Tabla 38 se proporcionan las áreas bajo las curvas ROC y las tasas de detección de trisomía 21 para distintas tasas de falsos positivos en la exploración por medio de la edad materna, el PAPP-A en suero, la beta hCG libre en suero, el PIGF en suero y sus combinaciones.

25 Los valores de la mediana de PIGF en trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía fueron significativamente menores que en el grupo euploide (Figura 8, Tabla 37). La media de log MoM de PIGF fue de -0,293 con una DE de 0,190. No se observó una asociación significativa ni en cada anomalía cromosómica individual ni en el grupo combinado entre el log MoM de PIGF y el log MoM de PAPP-A ($p = 0,119$), el log MoM de beta hCG libre ($p = 0,396$) o la TN delta ($p = 0,701$).

30 Los hallazgos de este estudio demuestran que, en primer lugar, en la trisomía 21, así como en otras anomalías cromosómicas importantes, la concentración de PIGF en suero materno a las 11⁺⁰-13⁺⁶ semanas de gestación disminuyó y, en segundo lugar, que la medición del PIGF puede mejorar el rendimiento de la exploración bioquímica del primer trimestre de trisomía 21 ofrecido por la beta hCG libre y la PAPP-A en suero materno.

35 En embarazos euploides, el PIGF en suero aumenta con la LCC fetal y, por tanto, con la edad gestacional, disminuye con el peso materno y es mayor en mujeres afroamericanas que en caucásicas y en fumadoras que en no fumadoras. En consecuencia, como en el caso de la PAPP-A, la concentración medida de PIGF se ajustó para dichas variables antes de comparar los resultados con embarazos patológicos. Los resultados para la trisomía 21 contradicen aquellos de estudios anteriores a menor escala que no ajustaron los valores medidos para las variables maternas e informaron que en embarazos afectados los valores o bien estaban aumentados o no eran significativamente diferentes de los controles normales.

40 Tanto en los embarazos euploides como en los embarazos con trisomía 21 se observó una asociación significativa entre los valores en suero de PIGF y PAPP-A, que probablemente refleja las funciones propuestas de dichos péptidos en el desarrollo placentario y/o su origen común a partir de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. No obstante, en los embarazos con trisomía 21 no hubo un cambio significativo en el PIGF en suero con la LCC fetal que indicara que la desviación entre embarazos trisómicos y euploides era la misma a las 11 y a las 13 semanas. Por el contrario, la desviación de la PAPP-A en suero entre embarazos trisómicos y euploides fue considerablemente mayor a las 11 que a las 13 semanas.

45 En una exploración bioquímica en el primer trimestre de trisomía 21 hubo contribuciones independientes significativas de parte de la edad materna y del PIGF, la PAPP-A y la beta hCG libre en suero. Se calculó que una exploración mediante una combinación de la edad materna y los tres marcadores bioquímicos mencionados identificaría alrededor del 70 % y 80 % de los embarazos afectados, con unas tasas respectivas de falsos positivos del 3 % y el 5 %. El valor de PIGF en suero en trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía es menor que en embarazos con fetos euploides y menor que en aquellos con trisomía 21. Por tanto, se prevé que una consecuencia ventajosa de la incorporación del PIGF en una exploración combinado en el primer trimestre de trisomía 21 sería la detección de una proporción alta de las otras aneuploidías importantes.

Tabla 34. Estudios que informan de valores del factor de crecimiento placentario en suero en embarazos euploides y con trisomía 21

Autor	Gestación	Trisomía 21		Controles euploides		Valor p
	(semanas)	n	Mediana	n	Mediana	
Spencer <i>et al.</i> 2001 ⁴	10-13	45	1,26 MoM	493	1,0 MoM	< 0,0001
Debieve <i>et al.</i> 2001 ⁵	15-20	24	0,69 MoM	102	0,89 MoM	< 0,001
Su <i>et al.</i> 2002 ⁶	14-21	36	1,45 MoM	320	1,0 MoM	< 0,001
Lambert-Messerlian <i>et al.</i> 2004 ⁷	15-20	39	1,01 MoM	195	1,0 MoM	NS

Tabla 35. Características maternas en casos y controles euploides

Característica materna	Control (n=609)	Trisomía 21 (n=90)	Trisomía 18 (n=28)	Trisomía 13 (n=19)	Síndrome de Turner (n=28)	Triploidía (n=10)
Edad materna en años, mediana (rango)	32,7 (16,1-45,2)	37,9(19,1-46,5) [‡]	37,9 (25,3-42,6) [‡]	34,8 (29,6-44,6) [†]	29,9 (18,1-37,9)*	31,9 (20,8-37,6)
Peso materno en kg, mediana (rango)	65,0 (42-143)	66,5 (42-109)	71,4 (52-90)	72,0 (52-85)	66,9 (39-114)	65,7 (50-89)
Longitud céfalo-caudal en mm, mediana (rango)	64,0 (45-84)	65(47-84)	57,7(47-71) [‡]	60,1 (51-73)*	64,6 (50-79)	58,4 (45-74)*
Etnicidad						
Blanca, n (%)	441 (72,4)	81(90,0) [‡]	19 (67,9)	15(78,9)	26(92,9)*	8(80,0)
Negra, n (%)	99 (16,3)	4(4,4) [†]	4(14,3)	2(10,5)	2(7,1)	2(20,)
India o paquistaní, n (%)	34(5,6)	3 (3,3)	4(14,3)	1 (5,3)	0	0
China o japonesa, n (%)	13(2,1)	1(1,1)	0	0	0	0
Mixta, n (%)	22 (3,6)	1(1,1)	1 (3,6)	1(5,3)	0	0
Nulípara, n (%)	277 (45,5)	28(31,1)*	12(42,9)	4(21,1)*	13 (46,4)	7(70,0)
Fumadora, n (%)	31(5,1)	6(6,7)	1(3,6)	1(5,3)	2(7,1)	1(10,0)
Concepción						
Espontánea, n (%)	594(97,5)	64(71,1) [‡]	12(42,9) [‡]	15(78,9) [†]	18(64,3) [‡]	8(80,0)*
Inductores de la ovulación, n (%)	10(1,6)	25(27,8) [‡]	16(57,1) [‡]	2(21,1) [†]	10(35,7) [‡]	2(20,0)*
Fecundación <i>in vitro</i> , n (%)	5(0,8)	1(1,1)	0	0	0	0

Comparación con grupo euploide (test chi-cuadrado para variables categóricas y análisis de varianza para variables continuas): * p < 0,05, † p < 0,01, ‡ p < 0,001

5

Tabla 36. Mediana (amplitud intercuartilo) MoM de factor de crecimiento placentario (PIGF) en suero materno, MoM de beta hCG libre, MoM de proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y translucencia nucal (TN) delta en embarazos euploides y con anomalías cromosómicas

Cariotipo	MoM de PIGF	MoM de beta hCG libre	MoM de PAPP-A	TN delta en mm
Euploide	0,991 (0,799-1,286)	0,980 (0,686-1,467)	1,070 (0,735-1,455)	0,1 (-0,1-0,3)
Trisomía 21	0,707 (0,493-0,904) [‡]	2,530 (1,550-3,725) [‡]	0,550 (0,376-0,805) [‡]	2,2 (1,2-3,8) [‡]
Trisomía 18	0,483 (0,352-0,701) [‡]	0,187 (0,142-0,300) [‡]	0,173 (0,142-0,246) [‡]	4,1 (1,0-6,0) [‡]
Trisomía 13	0,404 (0,369-0,596) [‡]	0,388 (0,273-0,482) [‡]	0,252 (0,203-0,321) [‡]	2,9 (0,3-4,7) [‡]
Síndrome de Turner	0,534 (0,410-0,717) [‡]	0,965 (0,593-1,755)	0,531 (0,409-0,820) [‡]	8,1 (6,7-10,8) [‡]
Triploidía	0,531 (0,437-0,668) [‡]	0,130 (0,036-0,336) [‡]	0,060 (0,041-0,080) [‡]	0,1 (-0,0-0,7)

Comparación con euploide (prueba Mann-Whitney) = * p < 0,05, † p < 0,01, ‡ p < 0,0001.

10

Tabla 37. Análisis de regresión logística para predecir la trisomía 21 por una combinación de edad materna, proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), beta hCG libre y factor de crecimiento placentario (PIGF)

Variable independiente	OR	95 % IC		p
Edad	1,190	1,116	1,269	<0,0001
Log MoM de PAPP-A	0,027	0,006	0,115	<0,0001
Log MoM de beta Hcg	671,150	150,215	2998,655	<0,0001
Log MoM de PIGF	0,001	0,000	0,013	<0,0001

5 Tabla 38. Rendimiento de la edad materna, MoM de factor de crecimiento placentario (PIGF), beta hCG libre y proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) en la detección de la trisomía 21

Prueba de exploración	Áreas bajo curva ROC
Edad materna, media (95 % IC)	0,759 (0,703-0,815)
PIGF, media (95 % IC)	0,775 (0,725-0,824)
Edad materna y PIGF, media (95 % IC)	0,843 (0,796-0,889)
Beta hCG libre y PAPP-A, media (95 % IC)	0,912 (0,876-0,949)
Edad materna, beta hCG libre y PAPP-A, media (95 % IC)	0,926 (0,892-0,960)
Beta hCG libre, PAPP-A y PIGF, media (95 % IC)	0,935 (0,905-0,964)
Edad materna, beta hCG libre, PAPP-A y PIGF, media (95 % IC)	0,946 (0,918-0,973)

	Tasas de detección para tasa fija de falsos positivos (%)	
	3	5
Edad materna, %	20,0	30,0
PIGF, %	22,2	27,8
Edad materna y PIGF, %	32,2	43,3
Beta hCG libre y PAPP-A, %	60,0	67,8
Edad materna, beta hCG libre y PAPP-A, %	71,1	76,7
Beta hCG libre, PAPP-A y PIGF, %	66,7	72,2
Edad materna, beta hCG libre, PAPP-A y PIGF, %	70,0	80,0

Tabla 40. MoM de PIGF, PP13, y ADAM12 para síndrome de Down, otras aneuploidías y embarazos no afectados

Resultado	PIGF	PP13	ADAM12
Síndrome de Down (26)	0,56 (0,19)**	0,88 (0,18)	0,85 (0,17)
Otras aneuploidías (22)	0,54 (0,17)***	0,55 (0,22)***	0,69 (0,11)*
Controles (83)	0,94 (0,24)	0,99 (0,19)	1,00 (0,17)

Significación en comparación con controles: *P<0,05; **P<0,0005; ***P<0,0001

Tabla 41. Centiles para marcadores

Marcador	<1	<5	<10	>90	>95	>99
PIGF	0,39	0,50	0,62	1,86	2,19	3,78
No fumadora	0,40	0,50	0,62	1,84	2,15	3,68
Fumadora	0,71	0,78	0,88	2,64	2,76	4,49
Caucásica	0,39	0,50	0,61	1,57	1,88	2,64
No caucásica	0,42	0,54	0,71	2,33	2,75	4,51

Tabla 42. Tasa de detección mediante distintas combinaciones de marcadores con tasas de falsos positivos fijas, presuponiendo que los parámetros para PIGF son los mismos a lo largo de la ventana de las 10-13 semanas

Combinación de marcadores	TD para TFP fijas		
	1 %	3 %	5 %
PAPP-A y beta hCG libre	33	49	58
PIGF, PAPP-A, y beta hCG libre	44	60	68
PAPP-A, beta hCG libre, y TN	75	84	87
PLGF, PAPP-A, beta hCG libre y TN	79	87	90

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto, comprendiendo el método:
 - 5 determinar uno o más marcadores de ultrasonidos en el feto; determinar la cantidad de factor de crecimiento placentario (PIGF), de proteína plasmática asociada al embarazo A (PAPP-A) y gonadotropina coriónica humana libre (beta hCG libre) en una o más muestras de sangre tomadas de una gestante; y
 - 10 determinar el riesgo de la anomalía cromosómica en el feto usando los uno o más marcadores de ultrasonidos del feto y las cantidades medidas de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha anomalía cromosómica se selecciona entre el grupo que consiste en trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, síndrome de Turner y triploidía.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que los uno o más marcadores de ultrasonidos son la translucencia nucal.
4. El método de la reivindicación 1, comprendiendo el método además determinar la cantidad de al menos un marcador bioquímico seleccionado entre proteína placentaria 13 (PP13) y metaloproteasa 12 (ADAM12) y determinar el riesgo de la anomalía cromosómica en el feto usando los uno o más marcadores de ultrasonidos del feto y las cantidades de PIGF, PAPP-A, beta hCG libre y el al menos un marcador bioquímico.
 - 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que las una o más muestras de sangre se extraen de la gestante en el primer trimestre del embarazo.
 - 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que las una o más muestras de sangre se extraen de la gestante entre las semanas 10 a 19 del embarazo.
 7. El método de la reivindicación 1, en el que las una o más muestras de sangre se extraen de la gestante entre las semanas 11 a 13 del embarazo.
 - 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende calcular un riesgo final basándose en el riesgo a priori de desarrollar la anomalía cromosómica y un conjunto de relaciones de probabilidad basándose en las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre.
 - 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que se lleva a cabo análisis Gaussiano multivariable para determinar las relaciones de probabilidad.
 10. El método de la reivindicación 8, que además comprende usar relaciones de probabilidad para uno o más parámetros del historial materno.
 - 40 11. Un aparato para determinar el riesgo de anomalía cromosómica en un feto, comprendiendo el aparato:
 - 45 un medio para introducir datos adaptado para introducir uno o más marcadores de ultrasonidos del feto y las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre en una o más muestras de sangre obtenidas de una gestante; y un medio de cálculo adaptado para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto usando los uno o más marcadores de ultrasonidos del feto y las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre.
 12. El aparato de la reivindicación 11, comprendiendo el aparato, además:
 - 50 un medio para introducir datos adaptado para introducir la cantidad de al menos uno de ADAM12 y PP13 en las una o más muestras de sangre obtenidas de la gestante; y un medio de cálculo adaptado para determinar el riesgo de una anomalía cromosómica en un feto usando los uno o más marcadores de ultrasonidos del feto, la cantidad de al menos uno de ADAM12 y PP13 y las cantidades de PIGF, PAPP-A y beta hCG libre.
 - 55 13. El aparato de la reivindicación 11, en donde el aparato determina además el riesgo de desarrollar preeclampsia, comprendiendo el aparato además:
 - 60 un medio para introducir datos adaptado para introducir una presión sanguínea de la gestante; y un medio de cálculo adaptado para determinar el riesgo de preeclampsia usando las cantidades introducidas de uno o más de PIGF y PAPP-A y la presión sanguínea.
 - 65 14. El método de la reivindicación 8, en el que el cálculo de una relación de probabilidad basándose en la cantidad de PIGF comprende determinar un múltiplo del valor medio para PIGF.

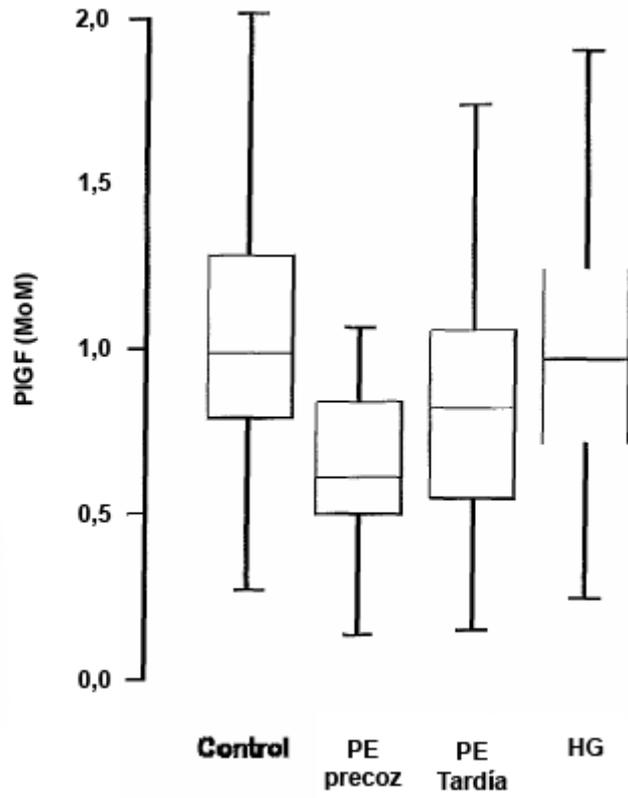


Figura 1

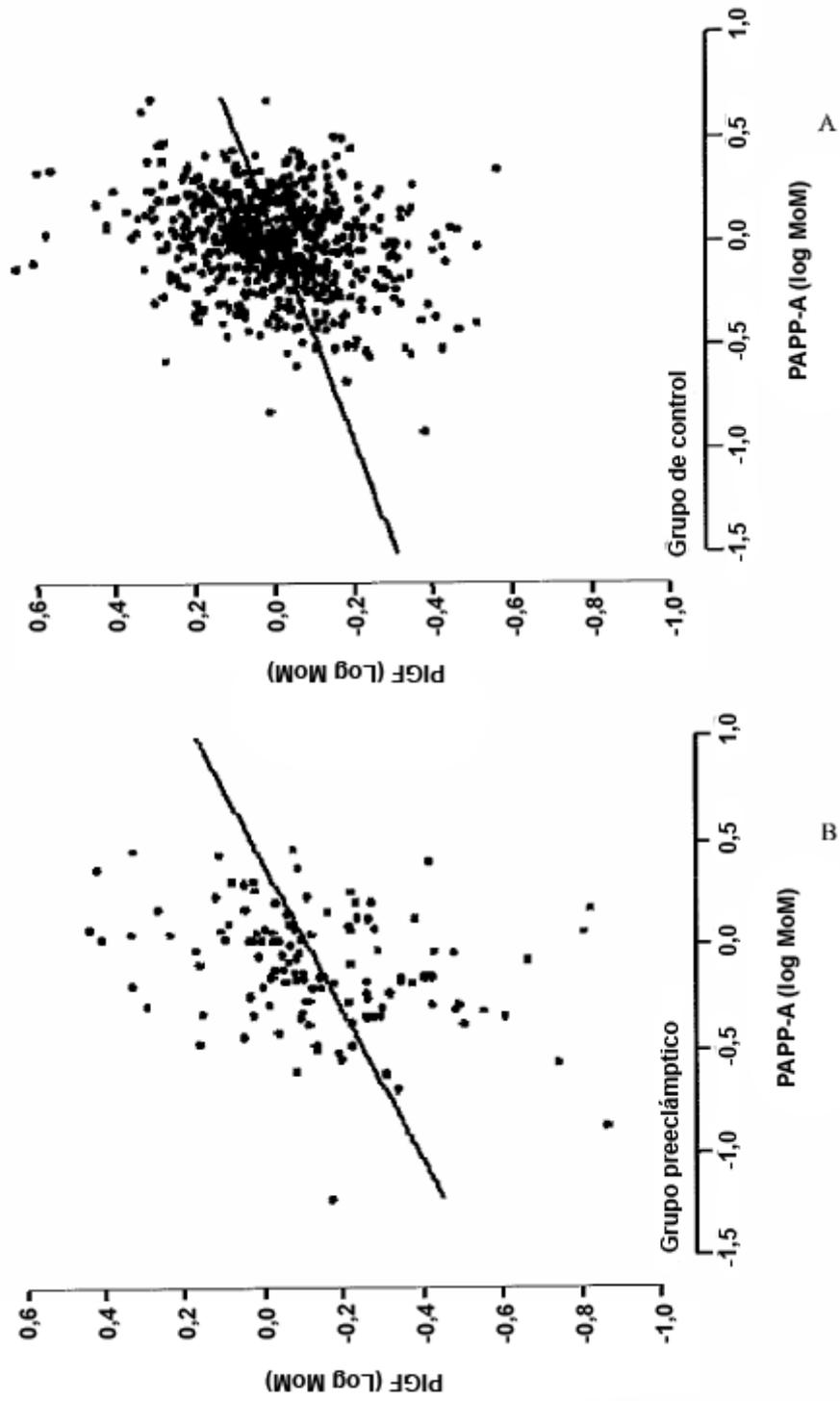


Figura 2A y B

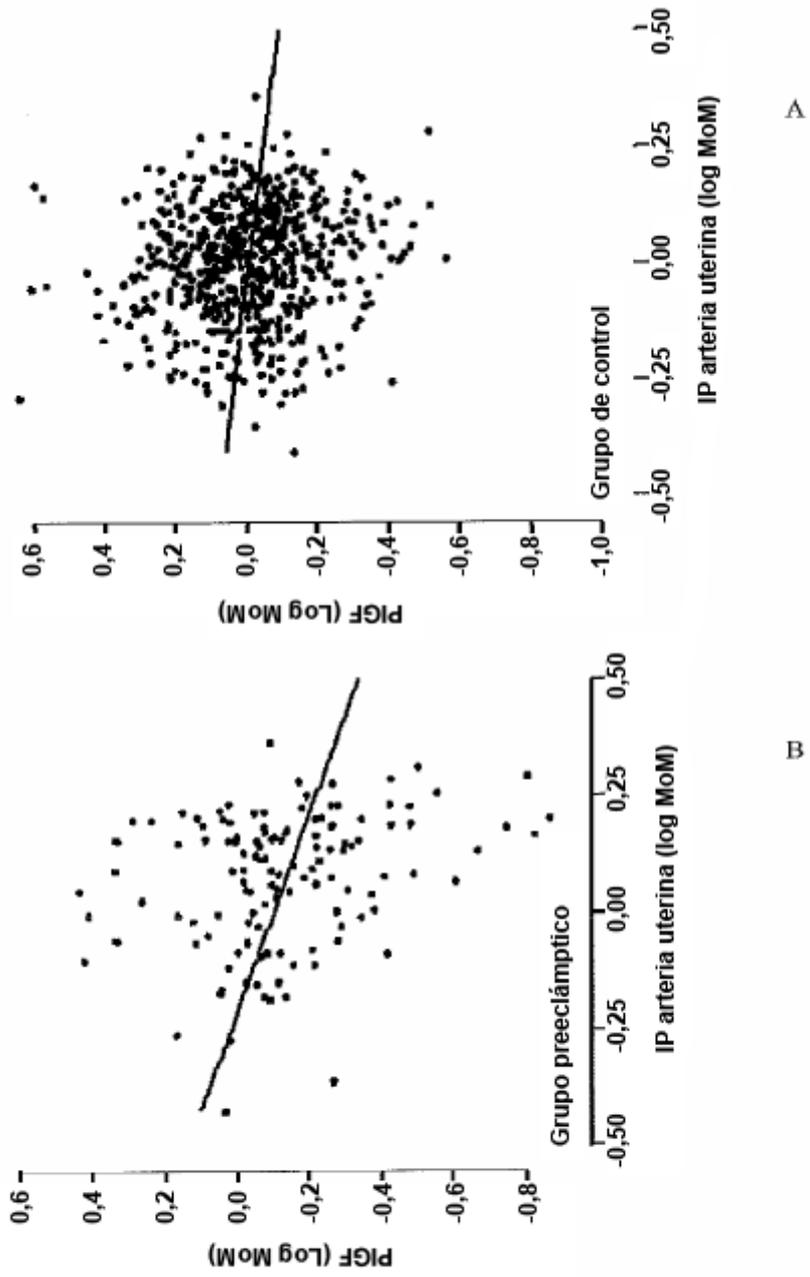


Figura 3A y B

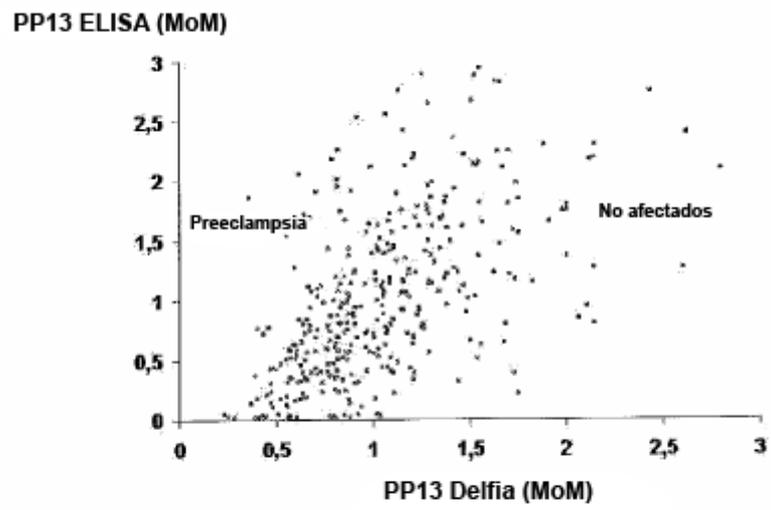


Figura 4

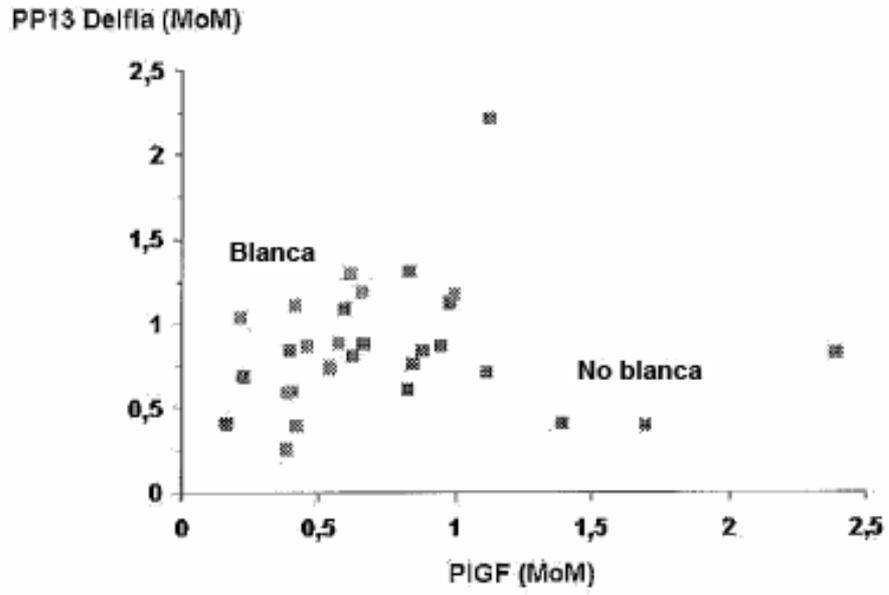


Figura 5

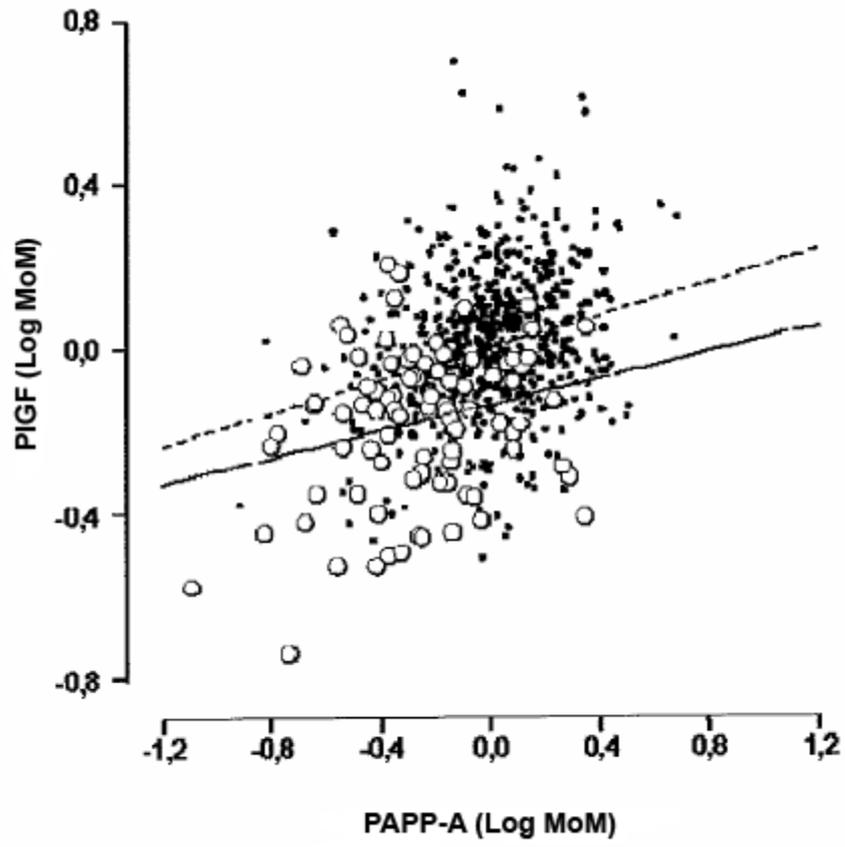


Figura 6

