



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 857**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04728206 .6**

86 Fecha de presentación : **19.04.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1616195**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **Examen para preeclampsia.**

30 Prioridad: **17.04.2003 GB 0308967**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **University College London**
Gower Street
London WC1E 9BT, GB

72 Inventor/es: **Savvidou, Makrina;**
Hingorani, Aroon;
Vallance, P. y
Nicolaides, Kypros

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Examen para preeclampsia.

5 Campo de la invención

La invención se refiere al diagnóstico de la susceptibilidad y a la prevención del desarrollo de preeclampsia y de retardo del crecimiento intrauterino (IUGR).

10 Antecedentes de la invención

La preeclampsia es un trastorno común que afecta del 3 al 5% de las gestaciones en seres humanos y que es responsable del 40% de los partos iatrogénicos en el Reino Unido. Forma parte de un grupo de trastornos hipertensivos que también incluyen eclampsia, hipertensión esencial crónica latente, trastornos renales e hipertensión gestacional transitoria. El trastorno se define típicamente como una hipertensión aguda acompañada por una proteinuria anormal que se desarrolla después de las 20 semanas de gestación en una mujer que previamente tenía una tensión normal (Davey DA *et al.* Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 892-8). También se asocia típicamente con edema pulmonar, cianosis, función hepática alterada, alteraciones visuales o cerebrales, dolor en la zona epigástrica o en el cuadrante superior derecho, recuento de plaquetas disminuido, retardo del crecimiento intrauterino (IUGR) u oliguria. Actualmente se sabe poco de la patogénesis de la preeclampsia, lo que limita el desarrollo de un ensayo predictivo fiable o de una profilaxis eficaz.

20 Sumario de la invención

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintasa (NOS) que compete con la unión del sustrato natural L-arginina. Se produce a partir de restos de arginina metilados en proteínas mediante metiltransferasas de proteínas (PRMT) y se metaboliza por la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH). La ADMA se produce en la unidad fetoplacentaria, que contiene grandes cantidades de DDAH II. Los inventores han demostrado por primera vez que los niveles de ADMA están aumentados en mujeres que posteriormente desarrollan preeclampsia y cuyos hijos desarrollan IUGR.

De acuerdo con la invención, se proporciona, por lo tanto, un método para identificar si una mujer gestante presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o si su feto presenta o no riesgo de desarrollar retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), comprendiendo el método:

a) medir la ADMA en una muestra de fluido tomada de una mujer gestante en una fase de gestación entre las 4 y las 25 semanas de gestación; y

b) determinar si la ADMA es o no mayor de 2,0 $\mu\text{mol/l}$ en la muestra de fluido, determinando de este modo si la mujer presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o si su feto presenta riesgo de desarrollar IUGR.

40 Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la dilatación mediada por flujo (FMD) de la arteria braquial a las 23 a 25 semanas de gestación en los diferentes grupos de mujeres dependiendo de la presencia o ausencia de incisuras bilaterales y del desenlace de la gestación. Las líneas horizontales ilustran la FMD media para cada grupo.

La figura 2 muestra los niveles en plasma de ADMA en los dos grupos de mujeres gestantes (con y sin incisuras bilaterales en el examen Doppler de la arteria uterina). Las líneas horizontales ilustran los niveles medios de ADMA en cada grupo.

La figura 3 muestra una representación dispersa que ilustra la relación entre la dilatación mediada por flujo y los niveles en plasma de ADMA en el grupo de mujeres gestantes que tenían incisuras bilaterales de las arterias uterinas a las 23 a 25 semanas de gestación y que finalmente desarrollaron preeclampsia. Se descubrió una correlación inversa significativa ($r = -0,8$, $p = 0,005$).

La figura 4 muestra la síntesis de ADMA a partir de restos de arginina metilados en proteínas por metilargininas de proteínas (PRMT) y su metabolismo hasta citrulina mediante la acción de las dimetilarginina dimetildiaminohidrolasas I y II (DDAH I y II).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para identificar si una mujer gestante presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o si su feto presenta o no riesgo de desarrollar IUGR. La invención se refiere, por lo tanto, a la diagnosis de la susceptibilidad de una mujer gestante a preeclampsia y a la diagnosis de la susceptibilidad de un feto a IUGR. La mujer gestante es un ser humano. El feto es un ser humano. La mujer o el feto que se diagnostican pueden encontrarse en el primer, segundo o tercer trimestre de gestación. La mujer o el feto están en una fase de gestación entre las 4 y las 25 semanas de gestación. La mujer o el feto pueden estar a una fase de gestación entre las 23 y las 25 semanas de gestación. Preferiblemente, la mujer o el feto están en una fase de gestación entre las 10 y las 25 semanas de gestación y más preferiblemente entre las 15 y las 25 semanas de gestación.

Típicamente, la mujer no tiene preeclampsia ni presenta síntomas de preeclampsia. Sin embargo, el método de la invención puede llevarse a cabo en mujeres que tienen preeclampsia pero no se les ha realizado la prueba. El método puede llevarse a cabo, por lo tanto, en mujeres que presenten síntomas preliminares de preeclampsia.

- 5 Típicamente, el feto no tiene IUGR ni presenta síntomas de IUGR. Sin embargo, el método de la invención puede llevarse a cabo en mujeres cuyos fetos tienen IUGR pero no se les ha realizado la prueba. El método puede llevarse a cabo, por lo tanto, en mujeres cuyos fetos presenten síntomas preliminares de IUGR.

10 La presente invención implica medir la ADMA en la mujer. Típicamente, se mide el nivel o la concentración de ADMA. De acuerdo con la presente invención, un nivel aumentado de ADMA en comparación con el nivel de gestación normal indica que la mujer es susceptible a o presenta riesgo de desarrollar preeclampsia o su feto es susceptible a o presenta riesgo de desarrollar IUGR. El nivel de gestación normal es típicamente el nivel de ADMA en una mujer que no presenta síntomas de preeclampsia o cuyo feto no presenta síntomas de IUGR durante la totalidad de la gestación. El nivel de gestación normal es típicamente en una fase de gestación equivalente.

15 La concentración media en plasma de ADMA en una población no gestante normal es típicamente de aproximadamente $0,82 \mu\text{mol/l}$. Generalmente, la concentración media en plasma de ADMA en un ser humano gestante normal es menor que la de un individuo no gestante normal y permanece relativamente constante durante toda la gestación. El nivel de gestación normal para un ser humano a las 4, 10, 15 y 25 semanas de gestación es típicamente de aproximadamente $0,3$ a $0,6 \mu\text{mol/l}$, por ejemplo, de $0,52 \mu\text{mol/l}$ en plasma.

25 En la presente invención, un nivel de ADMA en plasma aumentado asociado con una susceptibilidad a o un riesgo de desarrollo de preeclampsia aumentado o con una susceptibilidad a o un riesgo de desarrollo de IUGR aumentado es mayor de aproximadamente $2,0 \mu\text{mol/l}$. De acuerdo con la presente invención, el nivel o la concentración de ADMA en la mujer se aumenta preferiblemente en al menos 4 veces en comparación con el nivel de gestación normal. El nivel o la concentración de ADMA se eleva típicamente de 3 a 7 veces en comparación con el nivel de gestación normal.

30 La dimetilarginina simétrica (SDMA) es el estereoisómero biológicamente inactivo de la ADMA. La SDMA no se metaboliza por DDAH pero en su lugar se excreta por el riñón. La proporción de L-arginina/ADMA se usa típicamente como un índice de la inhibición de NOS. La proporción de ADMA/SDMA refleja típicamente la actividad de DDAH. La presente invención puede implicar también la evaluación de la proporción de ADMA/SDMA para determinar el riesgo de desarrollar preeclampsia.

35 De acuerdo con la presente invención, una proporción de ADMA/SDMA aumentada en comparación con la proporción de gestación normal indica que la mujer es susceptible a o presenta riesgo de desarrollar preeclampsia o que su feto es susceptible a o presenta riesgo de desarrollar IUGR. La proporción de gestación normal es la proporción de ADMA/SDMA en una mujer que no presenta síntomas de preeclampsia o cuyo feto no presenta síntomas de IUGR durante la totalidad de la gestación. La proporción de ADMA/SDMA normal es típicamente en una fase de gestación equivalente.

40 La proporción de gestación normal para un ser humano a las 4, 10, 15 y 25 semanas de gestación es típicamente de aproximadamente 1:1 a 1,3:1, por ejemplo, de 1,3:1 en plasma. En la presente invención, una proporción de ADMA/SDMA en plasma aumentada asociada con una susceptibilidad a o un riesgo de desarrollo de preeclampsia o IUGR aumentado a las 23 a 25 semanas es típicamente de aproximadamente 6,8:1. De acuerdo con la presente invención, la proporción de ADMA/SDMA en la mujer se aumenta preferiblemente en al menos 5 veces y más preferiblemente en al menos 6 veces en comparación con el nivel de gestación normal, por ejemplo, en la misma fase de gestación. La proporción de ADMA/SDMA se aumenta típicamente de 5 a 8 veces en comparación con el nivel de gestación normal. De acuerdo con la presente invención, una proporción de ADMA/SDMA por encima del 95% del intervalo de confianza para la proporción de gestación normal se asocia con un riesgo aumentado de desarrollar preeclampsia o IUGR.

50 La invención se lleva a cabo *in vitro* sobre una muestra obtenida de una mujer. La muestra comprende típicamente un fluido corporal de la mujer. La muestra es preferiblemente una muestra de sangre, plasma, suero u orina, pero puede ser fluido amniótico. La muestra se procesa típicamente antes de analizarse, por ejemplo por centrifugación. La muestra también puede almacenarse típicamente antes del ensayo, preferiblemente por debajo de -70°C .

55 Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para analizar el nivel de ADMA. Estos métodos implican típicamente poner la muestra en contacto con un anticuerpo capaz de unirse a la ADMA. Tales métodos incluyen ensayos de varillas y Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Típicamente, las varillas comprenden uno o más anticuerpos o proteínas que se unen específicamente a la ADMA. Si hay más de un anticuerpo presente, los anticuerpos tienen preferiblemente determinantes diferentes no solapantes de tal modo que pueden unirse a la ADMA de manera simultánea.

60 El ELISA es un ensayo en fase sólida heterogéneo que requiere la separación de los reactivos. El ELISA se realiza típicamente usando la técnica de sándwich o la técnica competitiva. La técnica de sándwich requiere dos anticuerpos. El primero se une específicamente a la ADMA y está unido a un soporte sólido. El segundo anticuerpo está unido a un marcador, típicamente un conjugado enzimático. Se usa un sustrato para la enzima para cuantificar el complejo ADMA-anticuerpo y, por lo tanto, la cantidad de ADMA en una muestra. El ensayo por inhibición competitiva del antígeno también requiere típicamente un anticuerpo específico de la ADMA unido a un soporte. Se añade un conju-

gado de ADMA-enzima a la muestra (que contiene la ADMA) a analizar. La inhibición competitiva entre el conjugado de ADMA-enzima y la ADMA no marcada permite la cuantificación de la cantidad de ADMA en una muestra. Los soportes sólidos para las reacciones de ELISA contienen preferiblemente pocillos.

La presente invención puede emplear también métodos para medir la ADMA que no comprendan anticuerpos. La separación por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) y la detección por fluorescencia se usan preferiblemente como un método para determinar el nivel de ADMA. Puede usarse el aparato de HPLC y los métodos descritos anteriormente (Tsikas D *et al.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 705: 174-6). La separación durante la HPLC se realiza típicamente en base al tamaño o a la carga. Antes de la HPLC, se añaden típicamente aminoácidos endógenos y un patrón interno de L-homoarginina a las muestras de ensayo y éstos se extraen en fases en cartuchos de CBA (Varian, Harbor City, CA). Los aminoácidos dentro de las muestras se derivan preferiblemente con *o*-ftalaldehído (OPA). La exactitud y la precisión del ensayo se determinan preferiblemente con muestras de control de calidad para todos los aminoácidos.

La presente invención puede usarse para confirmar la susceptibilidad en mujeres en las que ya se sospeche que presentan riesgo de o seleccionadas como predispuestas a desarrollar preeclampsia. La presente invención puede usarse también para confirmar la susceptibilidad en fetos en los que ya se sospeche que presentan riesgo de o seleccionados como predispuestos a desarrollar IUGR. Los factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad a desarrollar preeclampsia o IUGR incluyen típicamente ascendencia afrocaribeña, primerizas o primer embarazo con una pareja, gestaciones múltiples, hipertensión, diabetes, predisposición genética a o historia familiar de preeclampsia o de eclampsia, obesidad, hipercolesterolemia y consumo de tabaco. La presente invención puede usarse para determinar la susceptibilidad a desarrollar preeclampsia en fumadoras. La presente invención puede también usarse para determinar la susceptibilidad del feto de una fumadora a desarrollar IUGR.

Algunas realizaciones de la invención incluyen ensayos diagnósticos adicionales para determinar la susceptibilidad a preeclampsia o IUGR. Preferiblemente se emplea la dilatación mediada por flujo de la arteria braquial y/o el análisis de la morfología de las ondas Doppler de las arterias uterinas. Estos ensayos diagnósticos típicamente se llevan a cabo antes, al mismo tiempo o después de la medición del nivel de ADMA en una mujer gestante.

La dilatación mediada por flujo (FMD) de la arteria braquial es un método no invasivo establecido para evaluar la vasodilatación dependiente del endotelio. Implica típicamente medir los cambios en el diámetro de la arteria braquial en respuesta a un flujo aumentado usando ultrasonidos de alta resolución. Pueden usarse aparatos de ultrasonidos y métodos descritos anteriormente (Savvidou M D *et al.* Ultrasound Obstet Gynecol 2000; 15: 502-7; Dorup I *et al.* Am J Physiol 1999; 276: H821-5). El aparato incluye típicamente un transductor de serie lineal. Las imágenes diastólicas finales de la arteria pueden almacenarse en formato digital. El diámetro arterial se determina típicamente usando un algoritmo semiautomático de detección de bordes. El diámetro basal del vaso se calcula típicamente como la media de todas las mediciones durante el primer minuto de registro. La FMD de la arteria braquial se define como el porcentaje de aumento del diámetro del vaso durante la hiperemia reactiva inducida al inflar un manguito distal al sitio del registro a 300 mmHg durante 5 minutos, seguido de un desinflado rápido. El cambio en el flujo (hiperemia reactiva), un índice del estímulo de flujo para la dilatación, se calcula típicamente como [(flujo de sangre 15 segundos después de desinflar el manguito - flujo de sangre basal)/flujo de sangre basal] X 100%. Puede usarse como control la dilatación independiente del endotelio por trinitrato de glicerilo (GTN) por vía sublingual.

La FMD de la arteria braquial es típicamente de $8,59 \pm 2,76\%$ (n = 43) en mujeres humanas gestantes normales. De acuerdo con la invención, una reducción significativa de la FMD junto con un nivel de ADMA aumentado son indicativos de una susceptibilidad a o de un riesgo de desarrollar preeclampsia. La FMD de la arteria braquial se reduce preferiblemente dos veces, o más preferiblemente al menos dos veces.

El análisis Doppler es un método de rutina usado para evaluar la morfología de las ondas de las arterias uterinas. El método se usa típicamente para identificar la presencia o ausencia de incisuras protodiastólicas en la morfología de las ondas de la arteria. Estas incisuras pueden ser unilaterales o bilaterales. De acuerdo con la invención, la presencia de una incisura unilateral o de incisuras bilaterales junto con un nivel de ADMA aumentado son indicativos de una susceptibilidad a preeclampsia o IUGR.

El método diagnóstico de la invención puede llevarse a cabo junto con otros ensayos o análisis genéticos para mejorar la predicción del riesgo.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

Ejemplos

1. Métodos

Participantes en el Estudio

A todas las mujeres que acudieron para cuidados prenatales rutinarios al hospital King's College se les realizó un examen Doppler en color de las arterias uterinas a las 23-25 semanas de gestación (Acuson Aspen, California, Estados Unidos). La morfología de las ondas Doppler de las arterias uterinas se obtuvo como se ha descrito anteriormente (Albaiges G *et al.* Obstet Gynecol 2000; 96: 559-64). Cuando se consiguieron tres morfologías de ondas consecutivas

similares se anotó la presencia de una incisura protodiastólica y se calculó el índice medio de pulsatilidad (PI) de los dos vasos. En el momento del estudio Doppler se reclutaron 43 mujeres gestantes con morfologías de las ondas Doppler de las arterias uterinas anormales identificadas consecutivamente (presencia de incisuras protodiastólicas bilaterales), y se agruparon por edad, grupo étnico y condición de fumadora con 43 mujeres gestantes morfologías de las ondas Doppler de las arterias uterinas normales. A su ingreso, todas las mujeres tenían gestaciones únicas, estaban sanas, no se estaban medicando, no tenían una historia personal o familiar de enfermedades cardiovasculares prematuras y tenían fetos apropiadamente desarrollados para la gestación. Se registró la edad materna, el grupo étnico, la condición de fumadora, el número de parto, el índice cardíaco y la BP. La BP se midió en el brazo derecho con el sujeto sentado usando un monitor ambulatorio de presión sanguínea (SpaceLabs Medical 90207, WA, Estados Unidos). Se tomaron tres mediciones y se calculó la media. El Comité de Ética Local aprobó el estudio y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito.

Evaluación de la Función Endotelial Materna

Se realizó la exploración por ultrasonidos de la arteria braquial derecha usando un transductor de serie lineal de 7 MHz y un sistema Aspen Acuson (California, Estados Unidos) como se ha descrito anteriormente, a las 23-25 semanas de gestación (Celermajer DS *et al.* Lancet 1992; 340: 1111-5; Savvidou M D *et al.* Obstet Gynecol 2000; 15: 502-7). Se adquirieron imágenes diastólicas finales de la arteria cada 3 segundos y se almacenaron en formato digital. Se determinó el diámetro arterial para cada imagen usando un algoritmo semiautomático de detección de bordes. El diámetro basal del vaso se calculó como la media de todas las mediciones durante el primer minuto de registro. La FMD de la arteria braquial se definió como el porcentaje de aumento del diámetro del vaso durante la hiperemia reactiva inducida al inflar un manguito distal al sitio del registro a 300 mmHg durante 5 minutos, seguido de un desinflado rápido. El cambio en el flujo (hiperemia reactiva), un índice del estímulo de flujo para la dilatación, se calcula típicamente como [(flujo de sangre 15 segundos después de desinflar el manguito - flujo de sangre basal)/flujo de sangre basal] X 100%. Todas las mediciones se realizaron por un técnico con experiencia y los datos de la FMD se analizaron a las 24 horas del estudio. En el laboratorio, la variabilidad interobservador para la FMD es de $1,02 \pm 0,6\%$ (95% límite de conformidad: -1,7-2,4%) (Savvidou M D *et al.* Obstet Gynecol 2000; 15: 502-7). Fuera del entorno de gestación, la dilatación independiente del endotelio por trinitrato de glicerilo (GTN) por vía sublingual se usa comúnmente como un control, pero en el presente estudio se evitó el uso de GTN. Sin embargo, un estudio previo ha demostrado que la dilatación inducida por GTN no se altera como resultado de la gestación (Dorup I *et al.* Am J Physiol 1999; 276: H821-5).

Análisis de Dimetilargininas Asimétrica y Simétrica y de L-arginina en Plasma

Se tomó una muestra de sangre (5 ml) en tubos con citrato en el momento de los estudios vasculares para la medición de las concentraciones de ADMA, SDMA y L-arginina en plasma. Treinta y ocho mujeres del grupo de control y 40 mujeres con incisuras bilaterales en las uterinas estuvieron de acuerdo con que se les tomaran muestras de sangre. Después de la centrifugación, el plasma se almacenó a -70°C hasta su análisis. Los aminoácidos endógenos y el patrón interno de L-homoarginina añadidos a las alícuotas de 0,5 ml de las muestras de plasma (a $10 \mu\text{mol/L}$) se extrajeron en fase sólida en cartuchos de CBA (Varian, Harbor City, CA), se derivaron con *o*-ftalaldehído (OPA), y los derivados del OPA se separaron por HPLC y se controlaron mediante detección de fluorescencia como se ha descrito anteriormente (Tsikas D *et al.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 705: 174-6). Los derivados del OPA de L-arginina, L-homoarginina, SDMA y ADMA se eluyeron a $8,8 \pm 0,1$, $10,9 \pm 0,1$, $14,8 \pm 0,2$ y $16,3 \pm 0,2$ min, respectivamente, (media $\pm$ DT, $n = 6$). La exactitud y la precisión se determinaron dentro de un conjunto de seis muestras de control de calidad coprocesadas para que estuvieran próximas al 100% y por debajo del 7,3%, respectivamente, para todos los aminoácidos.

Definición del Desenlace de la Gestación

Se obtuvo información sobre el curso de la gestación, incluyendo la edad gestacional, el tipo de parto y el peso al nacimiento del niño para todas las mujeres estudiadas. El manejo clínico de las mujeres que participaban en el estudio lo asumieron ginecólogos que eran conscientes de los resultados de los registros la morfología de las ondas de las arterias uterinas a las 23-25 semanas, pero que ignoraban los resultados de la FMD de la arteria braquial y de las mediciones de metilarginina. La preeclampsia se definió de acuerdo con los criterios de la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en la Gestación (Davey *et al.* Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 892-8). En esta clasificación, la preeclampsia se definió como hipertensión (una lectura de presión sanguínea diastólica ≥ 110 mmHg, o dos lecturas de presión sanguínea diastólica consecutivas de ≥ 90 mmHg separadas por al menos cuatro horas) junto con proteinuria (≥ 300 mg de proteína total en una recogida de orina de 24 horas o, si esto no estaba disponible, proteinuria de 2+ mediante varilla en dos ocasiones consecutivas separadas por al menos cuatro horas) que se desarrollan después de las 20 semanas de gestación en mujeres de tensión previamente normal. La IUGR se definió como un peso al nacimiento por debajo del quinto percentil para gestación y sexo del neonato (Gardosi J *et al.* Lancet 1992; 339: 283-7).

Análisis Estadístico

Se examinó la normalidad de la distribución continua de datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó una transformación logarítmica para los datos no distribuidos normalmente. Los datos descriptivos se expresan como media $\pm$ DT o como mediana [intervalo intercuartil] para los datos distribuidos de manera normal y no normal. Se usó el ensa-

yo t de Student para comparar variables entre las mujeres con y sin incisuras bilaterales. Se realizaron comparaciones entre múltiples grupos usando un análisis de una vía de la varianza seguido de una prueba post hoc (Tukey-Kramer). Se usó un prueba de chi-cuadrado (χ^2) para comparar variables categóricas entre grupos. Se realizaron análisis de regresión lineal univariable y multivariable cuando fueron apropiados. Los análisis estadísticos se realizaron usando el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (Versión 8).

2. Resultados

10 *Características Basales de los Participantes en el Estudio*

Ninguna de las mujeres con morfologías de las ondas Doppler en la arteria uterina normales desarrollaron preeclampsia y todas ellas dieron a luz a niños del tamaño adecuado. Las mujeres con incisuras bilaterales de las arterias uterinas a las 23-25 semanas ($n = 43$) se clasificaron en tres grupos según el desenlace de la gestación; las que no tuvieron complicaciones ($n = 19$, 44,2%), las que desarrollaron IUGR ($n = 14$, 32,6%) y las que desarrollaron PE ($n = 10$, 23,2%), incluyendo cuatro con IUGR.

Las características demográficas y clínicas, obtenidas a su ingreso en el estudio, según el desenlace de la gestación se presentan en la tabla 1. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en las características demográficas basales. Una mayor proporción de mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia eran fumadoras, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,43$). Las BP sistólica y diastólica fueron significativamente mayores en mujeres que finalmente desarrollaron preeclampsia, pero en cualquier caso estaban dentro del intervalo normal. Las mujeres que desarrollaron preeclampsia tenían una PI significativamente mayor de las arterias uterinas y dieron a luz fetos prematuros más pequeños en comparación con las mujeres que no tuvieron complicaciones de la gestación.

FMD Materna según el Desenlace de la Gestación

Se obtuvieron los registros de la FMD para todas las mujeres y se presentan en la Tabla 2 según el desenlace de la gestación. Las mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia, tenían una FMD significativamente menor ($3,58 \pm 2,76\%$) que las mujeres que no tenían incisuras y que tuvieron un parto normal ($8,59 \pm 2,76\%$, $p < 0,0001$) y que las mujeres que tenían incisuras bilaterales pero que tuvieron un parto normal ($8,15 \pm 4,32\%$, $p = 0,0001$, Figura 1). Las mujeres cuyas gestaciones se complicaron con IUGR también tenían menores FMD en comparación con las mujeres que no tenían incisuras y que tuvieron partos normales ($6,17 \pm 2,82\%$ frente a $8,59 \pm 2,76\%$, $p = 0,0004$). Las mujeres gestantes con un desenlace normal tuvieron una FMD similar independientemente de la ausencia o presencia de incisuras bilaterales ($8,59 \pm 2,76\%$ frente a $8,15 \pm 4,32\%$, $p = 0,92$). En un análisis de regresión múltiple, fueron predictores significativos de la FMD el tamaño basal del vaso ($p = 0,002$), el estado de subgrupo definido por el desenlace de la gestación ($p < 0,001$) y la condición de fumadora ($p < 0,001$). La diferencia en la FMD entre los grupos continuó siendo significativa aun después de ajustar por condición de fumadora.

Niveles de Dimetilargininas y de L-arginina

Las mujeres con incisuras bilaterales tenían niveles significativamente mayores de ADMA en comparación con las mujeres con morfologías de las ondas Doppler de la arteria uterina normales ($2,4 [1,97-3,14] \mu\text{mol/l}$ frente a $0,81 [0,49-1,08] \mu\text{mol/l}$, respectivamente, $p < 0,0001$, Figura 2). Las mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia tenían niveles significativamente mayores de ADMA en comparación con las mujeres que tuvieron gestaciones normales ($2,7 [2,21-3,21] \mu\text{mol/l}$ frente a $0,81 [0,49-1,08] \mu\text{mol/l}$, respectivamente, $p < 0,0001$, Tabla 3). A los niveles observados en mujeres que posteriormente desarrollaron preeclampsia, la ADMA inhibe competitivamente la síntesis enzimática de la NO a partir de L-arginina y atenúa la relajación dependiente del endotelio. La ADMA proporciona un mecanismo para el desarrollo de preeclampsia y conecta la resistencia vascular placentaria aumentada con la hipertensión materna que resulta de una disfunción endotelial materna sistémica. Los niveles de dimetilarginina simétrica (SDMA; un estereoisómero de ADMA sin efecto sobre la síntesis de NO) fueron similares en todos los grupos, aunque el resultado de la proporción molar de ADMA/SDMA fue significativamente mayor en mujeres con incisuras bilaterales y preeclampsia (Tabla 3). La concentración de L-arginina y la proporción molar de L-arginina/ADMA fueron marginalmente pero significativamente mayores en todas las mujeres con incisuras bilaterales y preeclampsia cuando se compararon con las que no lo presentaban. De manera interesante, a pesar de tener la menor FMD, las mujeres que desarrollaron PE tuvieron los mayores niveles en lugar de los menores niveles de L-arginina (Tabla 3).

Correlación de ADMA con la Función Endotelial

Los niveles de ADMA no se correlacionan significativamente con la FMD en el grupo de mujeres con morfología de las ondas Doppler normal. Sin embargo, existía una débil pero significativa correlación inversa entre los niveles de ADMA y FMD en plasma en el grupo de mujeres con incisuras bilaterales de las arterias uterinas ($r = -0,35$, $p = 0,02$). Para investigar adicionalmente esta relación, se realizaron análisis univariados entre los niveles de ADMA y de FMD en los tres subgrupos de mujeres con incisuras bilaterales que se diferenciaban por diferentes desenlaces de la gestación. Sólo en el grupo de mujeres gestantes que finalmente desarrollaron preeclampsia, existía una fuerte correlación inversa entre la ADMA y la FMD ($r = -0,8$, $p = 0,005$, Figura 3).

TABLA 1

Características demográficas y clínicas maternas y neonatales en cada grupo de mujeres según el desenlace de la gestación

Característica	Sin incisuras- Parto normal (n = 43)	Con incisuras- Parto normal (n = 19)	Con incisuras- Desarrollo de IUGR (n = 43)	Con incisuras- Desarrollo de PE (n = 10)
Edad gestacional en el examen (semanas)	23 (23-25)	24 (24-25)	24 (24-25)	24 (24-25)
Edad materna (años)	29 ± 5,3	27,1 ± 5,8	26,3 ± 6,2	28,2 ± 4,7
Fumadoras	7 (16,3%)	2 (10,5%)	4 (28,6%)	3 (30%)
Primerizas	22 (51,2%)	10 (52,6%)	12 (85,7%)	7 (70%)
Índice cardíaco (bpm)	83,1 ± 10,1	77,5 ± 13,1	80,2 ± 10,6	79,5 ± 11,4
BP sistólica (mmHg)	113,9 ± 8,9	114,2 ± 7,2	114,7 ± 9,6	125,6 ± 7,2*
BP diastólica (mmHg)	66,7 ± 6,8	64,2 ± 16	66 ± 5,9	75,4 ± 9†
PI media de las arterias uterinas	0,81 ± 0,23	1,49 ± 0,6†	1,85 ± 0,7*	1,69 ± 0,5†
Edad gestacional al parto (semanas)	39,4 ± 1,6	40 ± 1,7	38,6 ± 4	34,8 ± 3,5*
Peso al nacimiento (g)	3326 ± 460	3207 ± 408	2301 ± 727*	2074 ± 723*

*p < 0,0001, †p < 0,001

Todas las comparaciones se realizaron con el grupo de mujeres sin incisuras bilaterales en la exploración

ES 2 295 857 T3

TABLA 2

Características vasculares maternas en cada grupo de mujeres según el desenlace de la gestación

Característica	Sin incisuras- Parto normal (n = 43)	Con incisuras- Parto normal (n = 19)	Con incisuras- Desarrollo de IUGR (n = 14)	Con incisuras- Desarrollo de PE (n = 10)
Dilatación mediada por flujo, FMD (%)	8,59 ± 2,76	8,15 ± 4,32	6,17 ± 2,82*	3,58 ± 2,76†‡
Diámetro basal del vaso (mm)	3,1 ± 0,35	3,17 ± 0,38	3,3 ± 0,52	3,2 ± 0,4
Flujo de sangre basal (ml/min)	182,2 (90,3-278)	181,5 (82,5-210,6)	128,6 (86-319)	194,4 (100-367)
Hiperemia reactiva (%)	473 (245-805)	614,5 (359-925)	605,5 (215-926)	381,3 (163-940)

*p = 0,004, comparación con mujeres sin incisuras y parto normal.

†p < 0,0001 comparación con mujeres sin incisuras y parto normal.

‡p < 0,0001 comparación con mujeres con incisuras y parto normal

TABLA 3

Niveles de ADMA, SDMA y L-arginina en cada grupo de mujeres según el desenlace de la gestación

Característica	Sin incisuras- Parto normal (n = 38)	Con incisuras- Parto normal (n = 16)	Con incisuras- Desarrollo de IUGR (n = 14)	Con incisuras- Desarrollo de PE (n = 10)
ADMA en plasma (μmol/l)	0,81 (0,49-1,08)	1,99* (1,69-2,38)	3,04* (2,39-3,54)	2,78 (2,21-3,21)
SDMA en plasma (μmol/l)	0,61 (0,43-0,76)	0,51 (0,18-0,69)	0,54 (0,34-0,7)	0,51 (0,27-0,77)

ES 2 295 857 T3

L-arginina en plasma (μmol/l)	21,9 (19,4-25,8)	23,5 (22,2-27,6)	28,3† (23,6-33,7)	31,1* (24,6-35)
Proporción molar de ADMA/SDMA	1,27 (0,97-1,68)	4,6* (3,1-13,5)	5,65* (3,97-8,87)	6,8* (3,92-8,72)
Proporción molar de L-arginina/ADMA	31,1 (21,4-39,7)	11,09* (8,85-15)	8,93* (7,36-14,17)	11,27* (8,74-15,17)

*p < 0,0001, †p < 0,005

Todas las comparaciones se realizaron con el grupo de mujeres sin incisuras bilaterales en la exploración.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar si una mujer gestante presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o si su feto
5 presenta o no riesgo de desarrollar retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), comprendiendo el método:
- a) medir la dimetilarginina asimétrica (ADMA) en una muestra de fluido tomada de una mujer gestante en una fase
de gestación entre las 4 y las 25 semanas de gestación; y
- 10 b) determinar si la ADMA es o no mayor de $2,0 \mu\text{mol/l}$ en la muestra de fluido, determinando por lo tanto si la
mujer presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o si su feto presenta riesgo de desarrollar IUGR.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mujer gestante se encuentra en una fase de gestación
entre las 10 y las 25 semanas de gestación.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la mujer se encuentra en una fase de gestación entre las
15 y las 25 semanas de gestación.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que determinar si la mujer
20 presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o determinar si su feto presenta o no riesgo de desarrollar IUGR
comprende determinar si el nivel de ADMA de la mujer es o no de al menos 3 veces el nivel de gestación normal.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que determinar si la mujer
25 presenta o no riesgo de desarrollar preeclampsia o determinar si su feto presenta o no riesgo de desarrollar IUGR
comprende determinar si la mujer presenta un aumento en la proporción de ADMA/dimetilarginina simétrica (AD-
MA/SDMA) que es mayor que la proporción de gestación normal.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende determinar si la proporción de ADMA/SDMA
es o no al menos 5 veces mayor que la proporción de gestación normal.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se sospecha que la
mujer gestante presenta riesgo de desarrollar preeclampsia o se sospecha que su feto presenta riesgo de desarrollar
IUGR.
- 35 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la mujer es una fumadora.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además realizar
un análisis de la morfología de las ondas Doppler de las arterias uterinas y/o de la dilatación mediada por flujo de la
arteria braquial en la mujer.
- 40

Figura 1

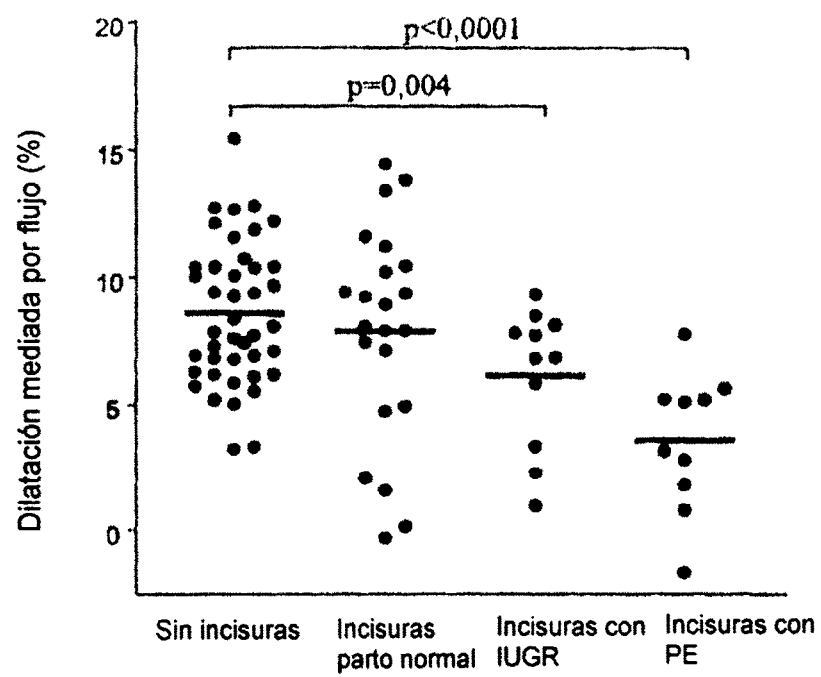


Figura 2

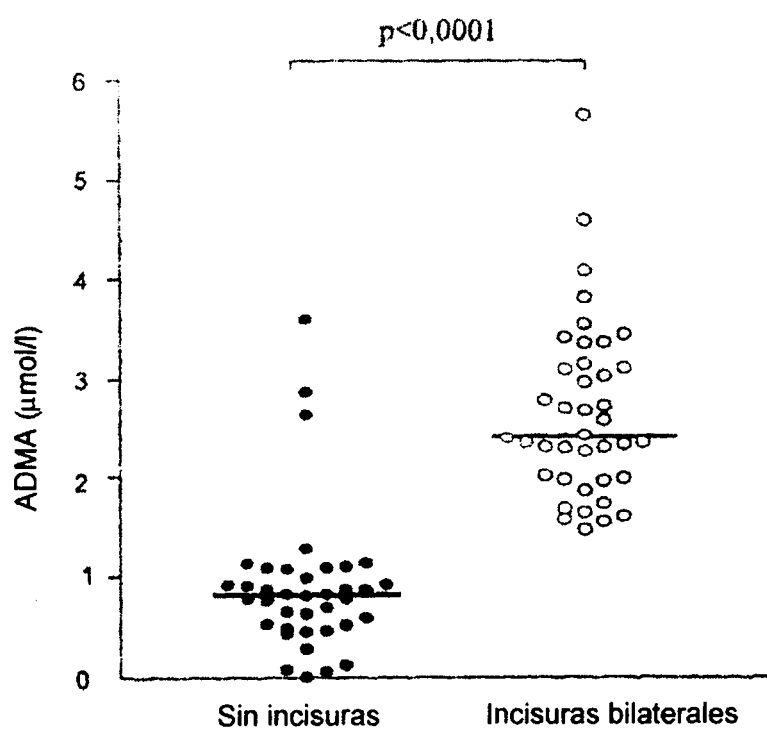


Figura 3

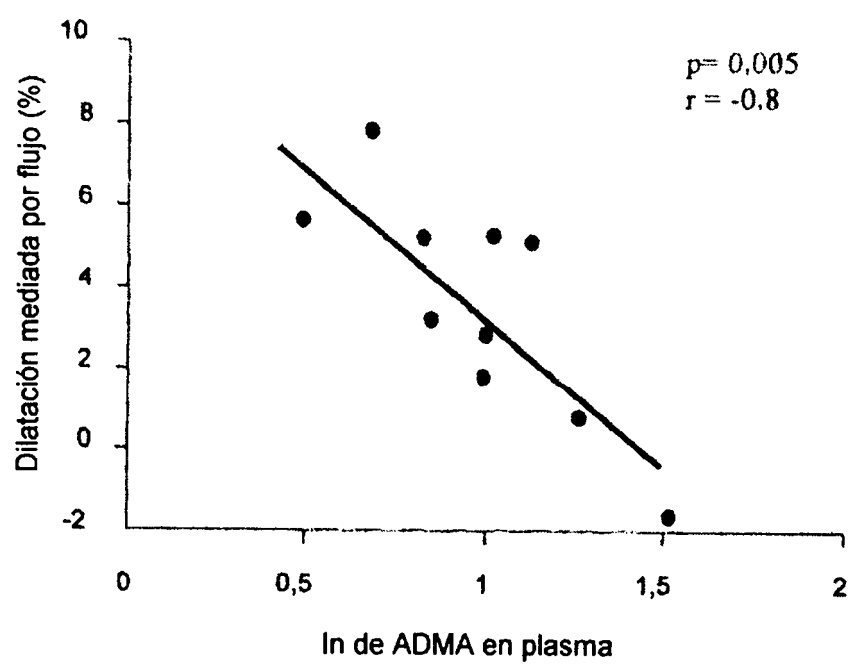


Figura 4

