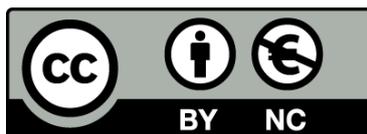




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Identificación y desarrollo de marcadores predictores de necesidad de finalización de la gestación por preeclampsia

Enric Sabrià Bach



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**



## IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO DE MARCADORES PREDICTORES DE NECESIDAD DE FINALIZACIÓN DE LA GESTACIÓN POR PREECLAMPSIA

Memòria de tesi doctoral presentada per

Enric Sabrià Bach

per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau dels directors de la tesi:

Dr. Jordi Ponce Sebastià

Professor associat

Dept. de Ciències Clíniques

Universitat de Barcelona

Dr. Francisco V. Álvarez Menéndez

Catedrático

Dept. de Bioquímica y Biología molecular

Universidad de Oviedo

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Desembre 2020



Jo, en Jordi Ponce Sebastià [REDACTED]  
professor associat Departament de Ciències clíniques Universitat de Barcelona,  
co-director i tutor de la tesi titulada:  
"IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO DE MARCADORES PREDICTORES DE NECESIDAD DE  
FINALIZACIÓN DE LA GESTACIÓN POR PREECLAMPSIA"  
del doctorand Enric Sabrià Bach [REDACTED]  
havent participat en la elaboració i avaluat el seu contingut fins el dia d'avui,

APROVO el dipòsit de l'esmentada tesis doctoral per a la seva avaluació i presentació a  
l'escola de doctorat de Medicina de la Universitat de Barcelona abans del 31/12/2020.

Confirmo que durant l'elaboració de l'esmentada tesis s'han complert els codis ètics i de bones  
pràctiques i no tinc coneixement de que s'hagi produït cap plagi.

Atentament,



Barcelona, 24 de novembre 2020

Yo, Francisco Vicente Álvarez Menéndez (NIF: [REDACTED]), catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Oviedo, codirector de la tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO DE MARCADORES PREDICTORES DE NECESIDAD DE FINALIZACIÓN DE LA GESTACIÓN POR PREECLAMPSIA" del doctorando Enric Sabrià Bach (NIF: [REDACTED]), habiendo participado en la elaboración i evaluado su contenido hasta el día de hoy, apruebo el depósito de la citada tesis doctoral per a la su evaluación y presentación a l'escola de doctorat de Medicina de la Universitat de Barcelona antes del 31/12/2020. También confirmo que se han seguido los códigos éticos durante la elaboración de la mencionada tesis doctoral y que no tengo constancia de que contenga ningún plagio.

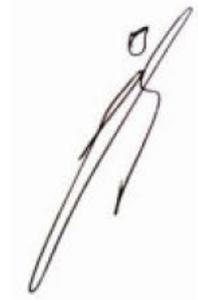
Atentamente,



Oviedo, 24 de noviembre 2020

Jo, Enric Sabrià Bach (DNI: ██████████) soc l'autor de la present memòria de tesi doctoral.  
Afirmo que la tesi és original i no conté plagi. Així mateix manifesto que conec i consento que  
la tesi doctoral podrà ser sotmesa a procediments per comprovar la seva originalitat.

Atentament,

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the author's name.

Barcelona, 24 de Novembre 2020.

## Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Dr. FV. Álvarez, su dedicación a este proyecto y persistencia en preguntarme por el avance de mis pesquisas. Es por una intuición suya que hemos llegado hasta aquí.

Sigo en catalán, que es la lengua con la que mejor expreso mis sentimientos.

Al Dr. J. Ponce, pel seu temps i per deixar-me un raconet al seu despatx on dedicar-me a les “meves coses”. Crec haver-li desvetllat l’obstetra que ell també porta dins.

Al Dr. Carles Barceló, per la seva paciència en atendre desinteressadament i aguantar que el tragués de la seva zona de confort. També agraeixo la teva sinceritat en moments en que no estava fent el correcte. Al teu costat he après molt.

Als meus pares, J. Sabrià i C. Bach. Entre les moltes coses que he après d’ells, hi ha quelcom més important que la medicina o la ciència. I això és que el propis límits no venen definits per ningú més que nosaltres mateixos. Per aquest motiu, no hi ha res que no sigui al nostre abast amb l’empenta necessària.

A na Marisa, que ploqui o nevi a seguit fent-me costat. “De vegades, ens en sortim”.

L’Ona i l’Aniol que encara no han entès què feia tantes hores el pare davant la pantalla si no estava mirant la tele.

Als avis dels meus fills, per facilitar la logística quan podien.

Al gran equip de ginecologia i obstetrícia de l’Hospital-Residència Sant Camil, la meua segona residència. Als meus companys, per deixar-me temps per dedicar a aquesta tesis doctoral que semblava que no s’havia d’acabar mai.

Als ginecòlegs de l’hospital de Bellvitge. Mestres, companys i amics a la vegada. Sí, m’agrada operar l’onco i fer models predictius de pre-eclàmpsia.

A tots els amics a qui no he dedicat prou atenció i en els que sovint penso. Els gironins exiliats, la “superpandy”, “los lunes al sol”.

A tots els companys, companyes i dones “pacients” que m’han fet aprendre del meu ofici i de la vida.

I finalment als canvis que ha comportat la pandèmia del coronavirus. El seu confinament i l’obligat canvi de rutines m’ha empès a tancar el cercle. Sense aquesta nova situació, m’hagués costat molt trobar un temps per dedicar-me a escriure la present tesis.

## Financiación

El coautor Carles Barceló Vidal de dos de los artículos que constituyen esta tesis doctoral ha obtenido financiación parcial del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del proyecto CODAMET (Ref: RTI2018-095518-B-C21, 2019-2021).

# Índice

Agradecimientos .....	IV
Financiación.....	VI
Índice.....	VII
Índice de figuras .....	IX
Índice de tablas .....	IX
Glosario .....	X
Enumeración de los artículos que componen la tesis.....	XII
Resumen del contenido de tesis doctoral.....	XIV
1. Introducción .....	1
1.1. Concepto .....	1
1.1.1. Definición y trastornos relacionados .....	1
1.1.2. Fisiopatología .....	5
1.2. Clasificación.....	14
1.3. Factores de riesgo .....	15
1.4. Formas de presentación.....	18
1.5. Causas de morbilidad materna y perinatal .....	19
1.6. Tratamiento y prevención.....	20
1.7. Cribado y predicción.....	22
1.7.1. Cribado en primer trimestre .....	22
1.7.2. Predicción bioquímica .....	24
1.7.3. Cribado en segundo y tercer trimestre .....	26
1.8. Situación actual .....	27
1.8.1. Epidemiología.....	27
1.8.2. Guías clínicas .....	27
1.8.3. Definición de preeclampsia.....	29
1.8.4. Clasificación.....	30
1.8.5. Modelos de cribado y predicción .....	31
1.9. Marcadores bioquímicos candidatos .....	33
1.9.1. Factores angiogénicos.....	33
1.9.2. NT-proBNP.....	33
1.9.3. Estrés oxidativo y ácido úrico.....	34
1.9.3.1. Estrés oxidativo .....	34
1.9.3.2. Ácido úrico.....	35

1.10.	Tratamiento estadístico de los marcadores pronósticos .....	36
2.	Hipótesis.....	38
2.1.	Justificación .....	38
2.2.	Hipótesis.....	39
2.3.	Objetivos .....	41
3.	Resultados .....	42
3.1.	Artículo 1 .....	42
3.2.	Artículo 2 .....	52
3.3.	Artículo 3 .....	63
4.	Discusión .....	88
4.1.	Cociente sFlt-1/PIGF.....	88
4.2.	NT-proBNP.....	91
4.3.	PP-13 .....	92
4.4.	Predicción pronóstica en preeclampsia .....	93
4.5.	Limitaciones .....	93
4.6.	Implicaciones.....	94
4.7.	Cuestiones abiertas y perspectivas futuras.....	98
4.8.	Desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia.....	102
5.	Conclusiones.....	104
6.	Bibliografía .....	105
7.	Anejos.....	113
7.1.	Consentimiento informado .....	113
7.2.	Dictamen del comité ética .....	117
7.3.	Material suplementario del artículo 2 .....	118
7.4.	Material suplementario del artículo 3 .....	121

## Índice de figuras

Figura 1: Angiogénesis uteroplacentaria.....	6
Figura 2: Mecanismo de acción de los factores angiogénicos .....	8
Figura 3: Manifestación multisistémica de la disfunción endotelial.....	9
Figura 4: Determinantes de la predisposición materna a la preeclampsia.....	11
Figura 5: Razón de verosimilitud positiva de los factores de riesgo de preeclampsia.....	17
Figura 6: Origen de las especies reactivas de oxígeno .....	35

## Índice de tablas

Tabla 1: Alteraciones de la tensión arterial que se pueden presentar durante el embarazo .....	4
Tabla 2: Factores de riesgo de preeclampsia .....	16
Tabla 3: Modificación de la razón de verosimilitud de los factores de riesgo de preeclampsia	17
Tabla 4: Factores desencadenantes de las alteraciones de la tensión arterial durante la gestación .....	18
Tabla 5: Comparación de los múltiples modelos de cribado y predicción de preeclampsia. ....	31

## Glosario

AAS: ácido acetil salicílico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ACOG: Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (*America College of Obstetricians and Gynecologists*).

ERO: especies reactivas de oxígeno

GEE: *Generalized Estimating Equations*

HELLP: hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas (*Hemolysis, Elavated Liver enzims, Low Platelet count*)

ISSHP: Sociedad Internacional para el estudio de Hipertensión en el Embarazo (*International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*)

MoM: múltiples de la mediana

NST: *Non-Stress Test*. Registro cardio-toco gráfico para la comprobación del bienestar fetal.

NT-proBNP: prohormona N-terminal del péptido natriurético tipo B

O<sub>2</sub>: oxígeno molecular

PROGNOSIS study: (*PRediction of short-term Outcome in preGNant wOmen with Suspected preeclampsia Study*)

PIGF: factor de crecimiento placentario

PP13: proteína placentaria 13

RCIU: Retraso de crecimiento intrauterino

S: sensibilidad o tasa de detección

sEng: endoglina soluble

sFlt-1: receptor soluble de tirosina quinasa (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*)

SG: semanas de gestación

TFP: Tasa de falsos positivos

X

TGF: factor de crecimiento transformante ( $\alpha$ ,  $\beta$ )

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VPN: valor predictivo negativo

## Enumeración de los artículos que componen la tesis

Tesis en formato de compendio de artículos. La tesis consta de 6 objetivos (3 primarios, 2 secundario y un terciario) y 3 artículos:

1. Sabrià E, Lequerica-Fernández P, Lafuente P, Ángeles EE, Escudero AI, Martínez-Morillo E, et al. Use of the sFlt-1/PlGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? Clin Chem Lab Med. 2018; 56: 303 – 311.

IP: 3.638. Percentil 84.48 de la categoría: Medical Laboratory Technology

Este artículo satisface el objetivo:

- Primario 1: Evaluar la validez externa de los resultados del estudio PROGNOSIS en las primeras determinaciones, tomando como suceso a analizar la necesidad de finalizar la gestación debido a preeclampsia durante la siguiente semana a la primera determinación. Si se confirma esta hipótesis, los próximos objetivos se centrarán en las gestantes con el cociente sFlt-1/PlGF mayor a 38.

2. Sabrià E, Lequerica-Fernández P, Lafuente P, Ángeles EE, Escudero AI, Martínez-Morillo E, et al. Use of the sFlt-1/PlGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? Clin Chem Lab Med. 2018; 56: 303 – 311.

IP: 5.571. Percentil 93.75 de la categoría: Obstetrics and Gynecology

Este artículo satisface los objetivos:

- Primario 2: Evaluar el papel de los marcadores (cociente sFlt-1/PlGF, NT-proBNP y ácido úrico) en la predicción de parto con preeclampsia a la semana,

en determinaciones repetidas. Y comparar con uso exclusivo del cociente sFlt-1/PlGF.

- Secundario 1: Comparar el comportamiento de los marcadores (cociente sFlt-1/PlGF, NT-proBNP y ácido úrico) en retraso de crecimiento intrauterino aislado con las que presentan preeclampsia con parto pretérmino y gestaciones sin ninguna de estas circunstancias en distintos momentos del embarazo.
  - Secundario 2: Comparar el comportamiento de los marcadores (cociente sFlt-1/PlGF, NT-proBNP y ácido úrico) en hipertensión crónica con y sin preeclampsia con parto pretérmino en las últimas determinaciones.
3. Artículo pendiente de publicación: Development of a new prognostic prediction tool for early-onset preeclampsia.

Este artículo satisface los objetivos:

- Primario 3: Evaluar el papel de los marcadores (sFlt-1, PlGF, NT-proBNP y ácido úrico) en la predicción de parto con preeclampsia precoz (antes de la semana 34) a la semana, en determinaciones repetidas. Y comparar con uso exclusivo del cociente sFlt-1/PlGF.
- Terciario 1: Crear calculadora de riesgo de parto con preeclampsia a la semana y establecer punto de corte idóneo para considerar paciente de riesgo.

# Resumen del contenido de tesis doctoral

## 1.- Título de la Tesis

Español:

Identificación y desarrollo de marcadores predictores de necesidad de finalización de la gestación por preeclampsia

Inglés:

Identification and development of markers predicting the need of delivery induction due to preeclampsia

## 2.- Autor

Nombre: Enric Sabrià Bach

DNI: [REDACTED]

Línea de investigación (código): Càncer i genètica molecular humana (101267)

Programa de Doctorado: MEDICINA I RECERCA TRANSLACIONAL

Órgano responsable: Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

## RESUMEN (en español)

Esta tesis doctoral se ha centrado en la identificación y desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia en gestaciones con sospecha clínica de preeclampsia. Inicialmente, se ha valorado la validez externa de las conclusiones del estudio PROGNOSIS en nuestra población. Este estudio propone el uso del cociente sFlt-1/PIGF menor o igual a 38 para descartar la aparición de preeclampsia en una semana. Estas conclusiones se han confirmado en la muestra estudiada. Posteriormente, en las gestaciones con el cociente sFlt-1/PIGF mayor de 38, se ha valorado el papel de estos y otros potenciales marcadores pronósticos de preeclampsia (NT-proBNP y ácido úrico), permitiendo determinaciones repetidas en caso de persistencia de la sospecha clínica. Se ha valorado la dinámica de estos marcadores en gestaciones afectas de preeclampsia con parto prematuro comparado con la no afectas en varias circunstancias. Se

evidenció una elevación significativa de NT-proBNP en gestantes con preeclampsia en las 2 semanas previas al parto, mientras que la elevación del cociente sFlt-1/PIGF era previa. En gestaciones afectas de hipertensión crónica, NT-proBNP discriminó mejor que el cociente sFlt-1/PIGF las gestaciones afectas de preeclampsia. También se evidenció una elevación del cociente sFlt-1/PIGF en gestaciones con retraso de crecimiento sin preeclampsia, pero esta no se ha observado en NT-proBNP. Posteriormente, se ha desarrollado un modelo GEE que determina el riesgo poblacional de parto debido a preeclampsia en una semana. Este modelo incluye el cociente sFlt-1/PIGF, NT-proBNP y edad gestacional a la determinación. El ácido úrico quedó excluido durante la construcción del modelo. Finalmente, se ha construido un modelo predictivo de riesgo individual de parto en una semana por preeclampsia precoz, usando un modelo mixto que combina sFlt-1 MoM, NT-proBNP y la edad gestacional. Durante la construcción del modelo PIGF MoM ha quedado excluido, por bajo rendimiento diagnóstico. Se ha objetivado que los modelos que incluyen NT-proBNP tienen un rendimiento superior a los modelos basados únicamente en factores angiogénicos para la predicción de pronóstica de la preeclampsia. La metodología descrita abre un campo de investigación centrado en el desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia, originados por los efectos multisistémicos de esta insuficiencia placentaria. Las herramientas predictivas desarrolladas requieren de validación externa previa al uso clínico.

#### RESUMEN (en inglés)

This PhD Thesis has focused on the identification and development of preeclampsia prognostic factors in pregnancies with clinical suspicion of preeclampsia. Initially, we assessed the external validity of PROGNOSIS study conclusions in our population. This study showed that an sFlt-1/PIGF ratio of 38 or lower adequately rules-out the development of preeclampsia in one week. These findings have been confirmed on our study sample. Afterwards, these and other potential prognostic preeclampsia markers (NT-proBNP and uric acid) have been assessed in

pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio above 38, allowing repeated measurements if clinical suspicion persisted. We have also assessed the changes over time of these markers in pregnancies with preeclampsia and preterm delivery comparing with non-affected pregnancies under different circumstances. We observed a significant raise of NT-proBNP in pregnancies with preeclampsia in the two weeks previous to delivery. In pregnancies affected from chronic hypertension, NT-proBNP distinguished better than sFlt-1/PIGF ratio pregnancies with superimposed preeclampsia. An elevation of sFlt-1/PIGF ratio was also observed in pregnancies with fetal growth restriction without preeclampsia, while this did not occur with NT-proBNP. Subsequently, we developed a GEE model that determines risk of delivery due to preeclampsia in one week, at a population level. This model includes sFlt-1/PIGF ratio, NT-proBNP and gestational age at determination. Uric acid was excluded during the model construction process. Finally, a personal risk prediction tool of delivery due to early-onset preeclampsia has been built, using a mixed model that combines sFlt-1 MoM, NT-proBNP and gestational age. During the construction process, PIGF MoM has been excluded from the model due to low predicting performance. Models that include NT-proBNP have superior performance than models based only in angiogenic markers predicting preeclampsia prognosis. The described methodology opens a research field focused on the development of preeclampsia prognosis markers, mainly generated by the multisystemic effects of the placental dysfunction. The developed predicting tools require external validation before using them to assess pregnancy prognosis.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
MEDICINA I RECERCA TRANSLACIONAL

## 1. Introducción

### 1.1. Concepto

La preeclampsia es la expresión clínica materna de la insuficiencia placentaria. Esta expresión clínica materna es lo que la diferencia de otras formas de insuficiencia placentaria, como el retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) sin preeclampsia. Por otro lado, comparte con ellas las consecuencias fetales de esta insuficiencia placentaria.

#### 1.1.1. Definición y trastornos relacionados

La preeclampsia es un síndrome hipertensivo del embarazo caracterizado por daño endotelial en múltiples órganos. La severidad de la expresión clínica de esta alteración es muy variable, pudiendo llegar a formas que amenazan la vida de la madre, como son el síndrome caracterizado por hemólisis, transaminasemia y plaquetopenia (1), que corresponde al acrónimo HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*), y la eclampsia, caracterizada por convulsiones. Esta variabilidad clínica ha dado origen a que la definición de la misma haya cambiado con el tiempo. Previamente se había definido la preeclampsia como la nueva aparición de hipertensión y proteinuria después de las 20 semanas de gestación (2). Actualmente, esta definición se ha expandido para incluir la hipertensión combinada con disfunción renal, hepática y trombocitopenia. La proteinuria ya no es imprescindible para encajar en la definición de preeclampsia. Incluso la *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP) acepta la combinación de hipertensión de nueva aparición con insuficiencia placentaria en forma de RCIU, como diagnóstico de preeclampsia (3).

Las definiciones usadas para esta tesis son:

- Hipertensión: presión sanguínea  $\geq 140/90$  mmHg en dos mediciones separadas más de 24 h.

- Proteinuria:  $\geq 300$  mg de proteínas en orina recogida durante 24 horas o cociente proteína/creatinina  $\geq 30$  mg/mmol. Destacamos que la obtención de 2 o más cruces de proteínas en una tira reactiva o  $\geq 30$  mg de proteínas en muestra urinaria puntual no se considera diagnóstico de proteinuria.
- Preeclampsia(4):
  - Hipertensión y proteinuria de nueva aparición después de las 20 semanas de gestación.
  - En ausencia de proteinuria: Hipertensión de nueva aparición con la nueva aparición de uno de los siguientes:
    - Trombocitopenia ( $< 100\ 000/\mu\text{l}$ ).
    - Insuficiencia renal (concentración de creatinina  $> 1.1\text{mg/dl}$  o duplicación de la concentración de creatinina en ausencia de otra enfermedad renal).
    - Transaminasemia
    - Edema pulmonar.
    - Síntomas neurológicos.
    - Síntomas visuales.
- Preeclampsia sobreañadida: diagnóstico de preeclampsia en gestante con hipertensión crónica.
- Síndrome HELLP:
  - Hemólisis (Lactato deshidrogenasa  $> 600$  IU/L).
  - Transaminasemia (aspartato aminotransferasa  $> 70$  IU/L).
  - Trombocitopenia ( $< 100\ 000/\mu\text{l}$ ).
- RCIU: peso fetal por debajo del percentil 10 causado por un proceso patológico que inhibe el potencial crecimiento normal. Este proceso patológico debe ser demostrado después de las 22 semanas de gestación con oligohidramnios (índice de líquido

amniótico por debajo del percentil 10) o índice de pulsatilidad de la arteria umbilical por encima del percentil 95 en la ecografía Doppler.

Los trastornos hipertensivos del embarazo relacionados con la preeclampsia son (5):

- Hipertensión crónica: hipertensión previa a la gestación o diagnosticada antes de las 20 semanas de gestación. Habitualmente es debida a hipertensión esencial, pero es conveniente descartar causas renales, estenosis arterias renales o hiperaldosteronismo primario. El 25% de estas gestantes desarrollaran preeclampsia sobreañadida.
  - Hipertensión de bata blanca: Afecta una de cada cuatro gestantes con tensión elevada a la consulta que normalizan la tensión medida al domicilio. Es un tipo de hipertensión pregestacional que no es puramente benigna, ya que tiene un riesgo aumentado de preeclampsia (el doble que la población general 8%). También la mitad de estas gestantes desarrollarán hipertensión gravídica durante la gestación (6).
  - Hipertensión enmascarada: tipo de hipertensión pregestacional que se demuestra con el estudio de la tensión arterial durante 24h, ya que en la consulta no se observa. Su sospecha se genera al encontrar daño en los órganos diana de la hipertensión, sin evidenciar tensión elevada en la consulta. Su frecuencia y el efecto sobre la gestación han sido menos estudiados. No se recomienda su estudio si no se encuentra hipertrofia ventricular, retinopatía o enfermedad renal de etiología no explicada.
  - Hipertensión gravídica transitoria: Es una hipertensión *de novo* que se resuelve durante la gestación sin necesidad de tratamiento. El 20% de estas gestantes van a desarrollar preeclampsia y otro 20% hipertensión gravídica.
- Hipertensión gravídica: hipertensión *de novo* no acompañada de proteinuria ni otras características propias de la preeclampsia. Un 25% de estas gestantes desarrollarán

preeclampsia. Y este porcentaje es mayor cuanto menor sea la edad gestacional de presentación (7).

*Tabla 1: Resumen de las distintas alteraciones de la tensión arterial que se pueden presentar durante el embarazo, con sus respectivas consecuencias pronósticas.*

<b>Presentación</b>	<b>Cuando</b>	<b>Riesgo</b>	<b>Embarazo futuro</b>	<b>Largo plazo</b>
<b>Hipertensión de bata blanca</b>	Antes de las 20 semanas	8% preeclampsia 50% hipertensión gravídica		
<b>Hipertensión crónica</b>	Antes de las 20 semanas	25% preeclampsia RCIU		
<b>Hipertensión gravídica transitoria</b>	Después de las 20 semanas	20% hipertensión gravídica 20% preeclampsia		
<b>Hipertensión gravídica</b>	Después de las 20 semanas	25% preeclampsia	25% hipertensión gravídica 4% preeclampsia RCIU	Riesgo cardiovascular
<b>Preeclampsia</b>	Después de las 20 semanas	Complicaciones	15% hipertensión gravídica 15% preeclampsia RCIU	Riesgo cardiovascular

Tanto las gestantes afectas de hipertensión gravídica (8–10) como las gestantes afectas de preeclampsia tienen un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular y muerte por infarto agudo de miocardio, embolia y diabetes mellitus (11–13). Así mismo, aumenta el riesgo de

tromboembolismo venoso y enfermedad renal crónica, comparado con las gestantes normotensas.

En las gestaciones subsiguientes las gestantes con antecedente de hipertensión gravídica tienen un riesgo del 4% de desarrollar preeclampsia y del 25% de desarrollar hipertensión gravídica de nuevo. Las gestantes con antecedente de preeclampsia tienen un riesgo del 15% de desarrollar preeclampsia en una nueva gestación y del 15% de desarrollar hipertensión gravídica (14,15).

### 1.1.2. Fisiopatología

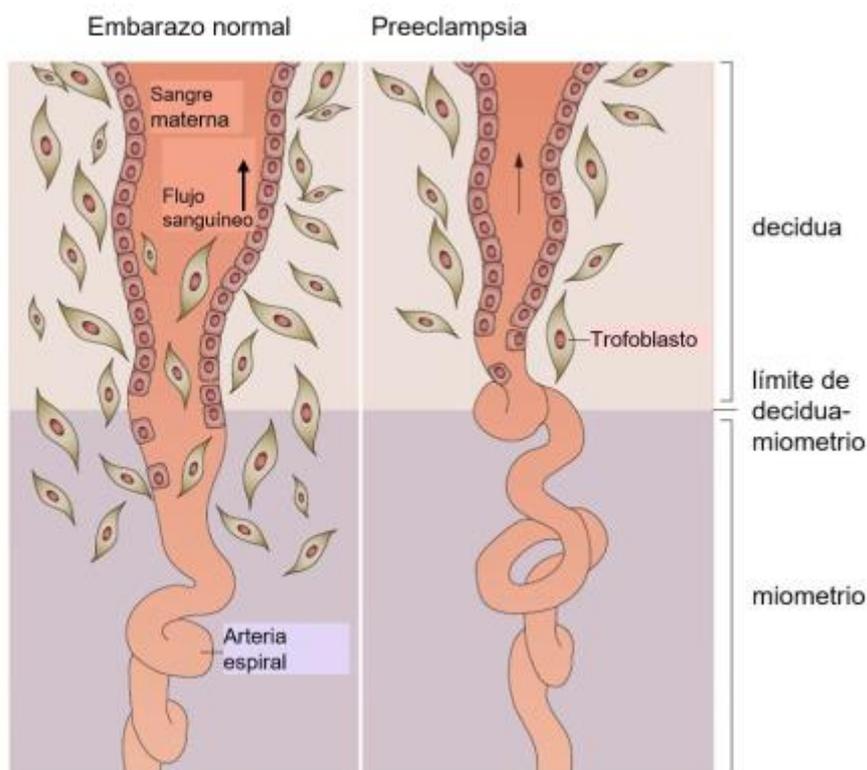
Aunque, en la actualidad, su patogenia no se conoce completamente, se ha establecido que la insuficiencia placentaria tiene un papel central en el desarrollo de la preeclampsia y los estados hipertensivos del embarazo. Esta disfunción placentaria es producida por una transformación anómala de las arterias espirales uterinas.

En una fase inicial de la gestación normal se produce una invasión de la pared de las arterias espirales por trofoblastos que destruyen su túnica media, aumentando su diámetro que incrementa el aporte sanguíneo hacia el espacio intervilloso (hasta diez veces), permitiendo así una adecuada perfusión placentaria. En la preeclampsia, la ausencia de invasión del segmento miometrial de la arteria espiral por los trofoblastos produce unas arterias espirales estrechas, con un patrón de flujo sanguíneo anómalo y una perfusión uteroplacentaria reducida (16–18).

Según la teoría de Roberts & Taylor, la invasión trofoblástica anómala lleva a una inadecuada perfusión placentaria durante el segundo trimestre de la gestación que produce la liberación de sustancias “tóxicas” a la circulación materna que desencadenan el cuadro clínico multisistémico (19,20).

El fallo en la transformación fisiológica de las arterias espirales no es específico ni suficiente para causar preeclampsia. Esta alteración es compartida con otras condiciones obstétricas, como el RCIU aislado (sin preeclampsia), *abruptio placentae* (desprendimiento de placenta) y la rotura prematura de membranas (20–26). Existen factores genéticos e inmunológicos adicionales implicados en la patogenia de la enfermedad que junto con los factores de riesgo facilitan la hipoperfusión placentaria. Esta produce la liberación de sustancias durante la segunda mitad de gestación que alteran el equilibrio angiogénico, aumentan el estrés oxidativo y producen la disfunción endotelial en múltiples órganos, apareciendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad: cuadro sistémico de microangiopatía generalizada y vasoespasmo.

Figura 1: Angiogénesis uteroplacentaria



Remodelación fisiológica de las arterias espiroideas que tiene lugar durante el embarazo y en la preeclampsia. En la preeclampsia, la invasión trofoblástica más superficial, conlleva unos vasos de menor calibre. Al aumentar los requerimientos de aporte sanguíneo durante la gestación, el menor calibre de los vasos conduce a una inadecuada perfusión placentaria. Modificado de Chaiworapongsa et al (128).

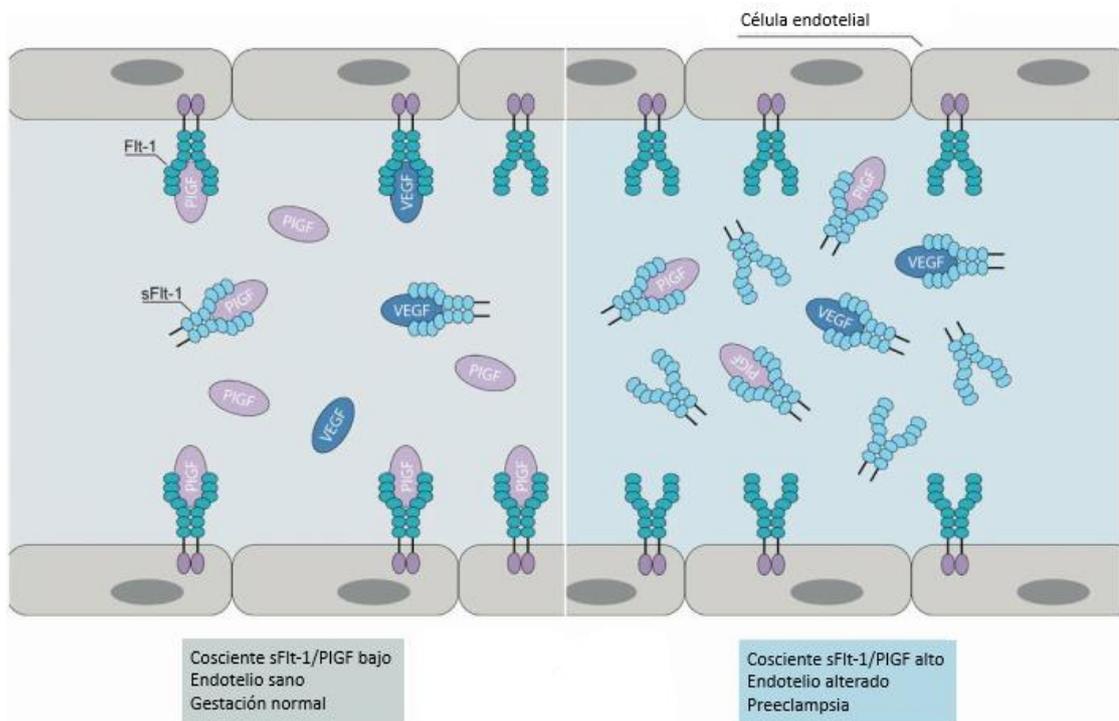
Varios factores angiogénicos juegan un papel importante en la fisiopatología de la preeclampsia:

- VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) es esencial para el desarrollo vascular de la placenta (27). Produce la internalización de la VE-cadherina, induciendo la separación intercelular, afecta la proliferación y migración de células endoteliales y aumenta la permeabilidad vascular (28). Este último efecto se produce principalmente en los vasos capilares, produciendo pérdida del contenido capilar y el consiguiente edema observado en la sepsis. También favorece la formación de coágulos y la adhesión leucocitaria (29).
- PIGF (*placental growth factor*): es un factor pro-angiogénico que forma parte de la familia factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Actúa potenciando la acción de VEGF-A y está abundantemente expresado en la placenta (30). Produce proliferación y migración celular en el crecimiento y maduración de nuevos vasos (31). También actúa produciendo dilatación de los vasos (32).
- Receptor soluble de tirosina quinasa (sFlt-1): es la forma soluble del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1 (Flt-1) y actúa uniéndose a PIGF y a VEGF con gran afinidad, bloqueando así la angiogénesis placentaria (33). Es importante en la regulación de la homeostasis angiogénica durante la gestación y en procesos en los que hay una activación endotelial fuera de la placenta (sepsis).
- Endoglina soluble (sEng): es un correceptor de la superficie celular del factor de crecimiento transformante (TGF) y actúa promoviendo la angiogénesis. La sEng es la forma soluble del correceptor, y dificulta la unión del TGF a la endoglina (34).

Las concentraciones séricas reducidas de PIGF en la preeclampsia no se pueden explicar exclusivamente teniendo en cuenta su síntesis a nivel placentario (35,36). Tanto sFlt-1 como

PlGF se expresan en placenta y otros tejidos por células vasculares endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso y monocitos. Fuera de la placenta, PlGF se expresa abundantemente en el daño endotelial con objeto de contrarrestar procesos relacionados con estados patológicos y no interfiere en el funcionamiento fisiológico de las células endoteliales quiescentes (37).

Figura 2: Mecanismo de acción de los factores angiogénicos



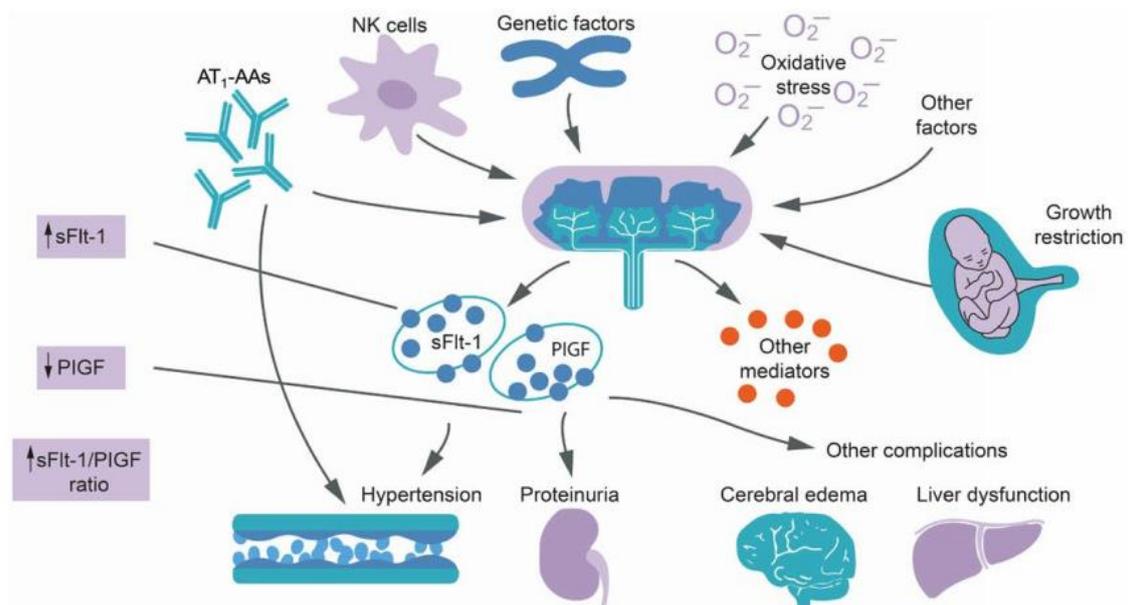
Papel de sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) y PlGF (placental growth factor) en el desarrollo de la preeclampsia. En la gestante, sFlt-1 se une e inhibe VEGF (vascular endothelial growth factor) y el PlGF circulante. En consecuencia, un cociente sFlt-1/PlGF elevada potencialmente causa la disfunción endotelial y el desarrollo de la preeclampsia. Elaborado por Benzing et al (129).

Cabe destacar, también, el papel de la proteína placentaria 13 (PP13), que es una proteína identificada en 1983 (38) que interviene en el reconocimiento celular y la apoptosis (39). No tiene receptor conocido. Produce una dilatación de la vascularización uterina (40,41) mediante la vía de las prostaglandinas y el óxido nítrico (42). Se sintetiza exclusivamente a nivel de

sincitiotrofoblasto y la membrana amniótica fetal (40). Su concentración en suero se correlaciona con su expresión placentaria.

La concentración de PP13 se mantiene estable durante las gestaciones normales hasta el tercer trimestre, en el que la concentración aumenta progresivamente hasta doblar o triplicar la concentración del primer trimestre (43,44). En las gestantes que desarrollan preeclampsia tiene un comportamiento bifásico. Se produce una reducción durante el primer trimestre, que es el cambio más precoz que se produce (45,46) y aumenta con la aparición de síntomas. A pesar de ser un buen candidato para el cribado y predicción de preeclampsia, veinte estudios han valorado su rendimiento predictivo con resultados negativos, siendo mejor predictor de RCIU y parto prematuro (47,48).

Figura 3: Manifestación multisistémica de la disfunción endotelial



La disfunción endotelial presente en múltiples órganos, ocasiona distintas manifestaciones clínicas observadas en las gestaciones afectas de preeclampsia. AT<sub>1</sub>-AAAs: anticuerpos agonistas para el receptor tipo 1 de la angiotensina 2. NK: células Natural Killer. sFlt1: soluble fms-like tyrosine kinase 1. PIGF: placental growth factor. Elaborado por Wang et al (130).

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, se llama angiogénesis y es esencial para el desarrollo de un embarazo exitoso (49). En la preeclampsia, así como en la sepsis, encontramos concentraciones elevadas de factores anti-angiogénicos, como la sFlt-1 y la sEng, y concentraciones disminuidas de factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento placentario (PlGF) y el VEGF (33,50). La preeclampsia y la sepsis difieren en la presentación clínica debido que durante el tercer trimestre del embarazo normal hay un mecanismo compensador de esta situación anti-angiogénica que consiste en la secreción de PP13 por parte de la placenta. En algunas gestantes esta compensación es insuficiente y se produce el cuadro clínico de preeclampsia.

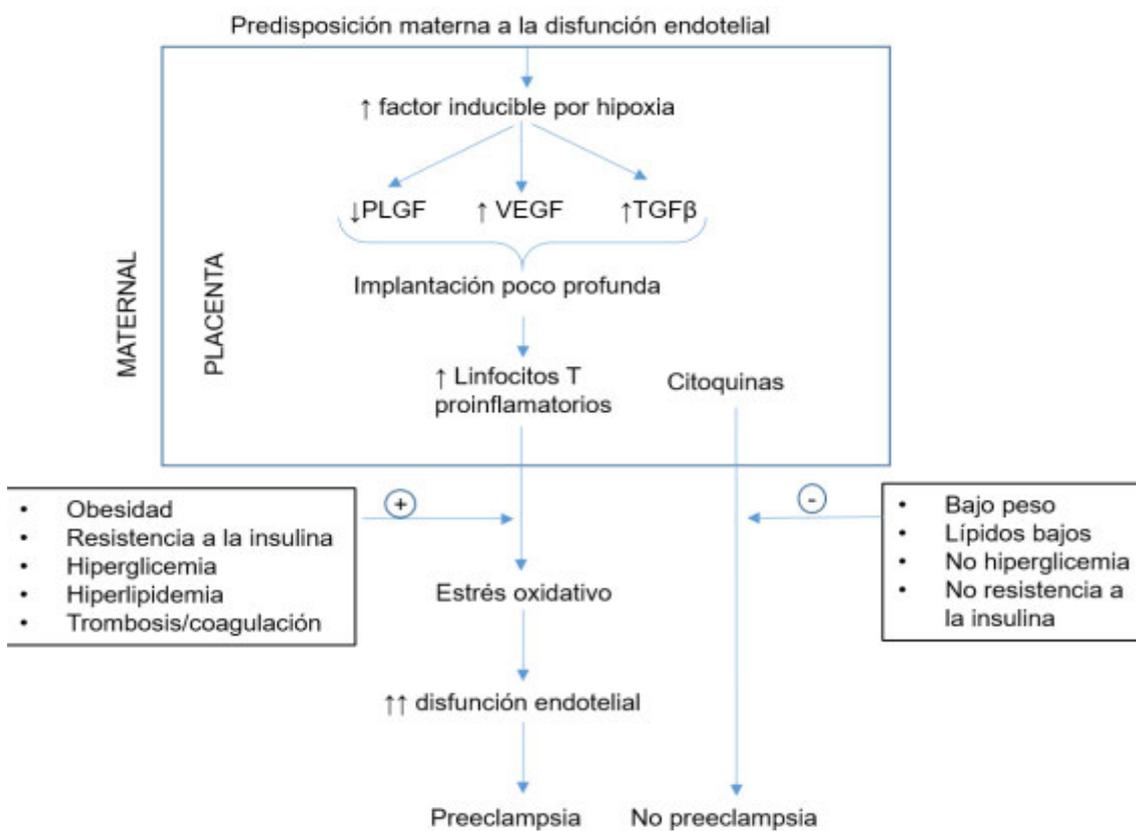
En todo caso, sigue sin estar claro porqué se desarrolla preeclampsia o RCIU, pues ambas patologías comparten los factores de riesgo mencionados e incluso el desequilibrio anti-angiogénico. Una posible explicación es que sea necesario superar un umbral de desbalance anti-angiogénico para que se desarrolle la preeclampsia, mientras que grados más leves de desbalance anti-angiogénico podrían dar lugar a formas variables de insuficiencia placentaria sin manifestaciones clínicas maternas. Este umbral podría variar dependiendo de la constitución materna. Según algunos autores (51), la condición que diferencia ambas patologías es una susceptibilidad materna, un síndrome metabólico presente en la PE, pero ausente en el RCIU aislado.

El síndrome metabólicos preexistente facilita la inflamación, favoreciendo el estrés oxidativo y alterando la función endotelial materna. La disfunción endotelial progresiva conduce a la hipoperfusión de órganos maternos y esta causa el inicio de los síntomas propios de la preeclampsia. Este umbral no se llega a cruzar en el caso de RCIU que no se acompaña de preeclampsia.

Además, el fundamento según el cual la preeclampsia se basa en una transformación anómala de las arterias espirales uterinas se ha puesto en duda por una publicación reciente en la que

se afirma que la mayoría de cambios histológicos observados en la insuficiencia placentaria son inespecíficos. Concretamente, se pone en duda concepto establecido de que la invasión trofoblástica superficial es más típica de la preeclampsia precoz y del RCIU (52). La evidencia de un análisis sistemático de estudios sobre preeclampsia precoz muestra que la mayoría de los casos de preeclampsia tenían placentas normales y que las lesiones en las vellosidades coriales también estaban presentes en una proporción de las gestaciones normales (53).

Figura 4: Determinantes de la predisposición materna a la preeclampsia



Modelo que sugiere el síndrome metabólico elemento diferencial entre la preeclampsia del retraso de crecimiento intrauterino. La perfusión placentaria insuficiente induce el desequilibrio angiogénico y el aumento del factor de crecimiento tumoral (TGFβ), generando una cascada inflamatoria a nivel placentario. Cuando ocurre esto, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo resultantes pueden llegar al umbral necesario que conduce a las manifestaciones clínicas de la preeclampsia. En caso contrario, se manifestaría como RCIU sin PE. Componentes del síndrome metabólico como el índice de masa corporal materna, el grado de resistencia a la insulina, las hiperglicemias e hiperlipidemia, así como las predisposiciones a la trombosis pueden cambiar el ambiente materno favoreciendo el desarrollo de la preeclampsia. Modificado de Ness et al (51).

Ante esta evidencia, han surgido nuevas hipótesis etiológicas de la preeclampsia. Dada la similitud en los factores de riesgo entre la preeclampsia y la enfermedad cardiovascular, se propone que al igual que la diabetes gestacional es una insuficiente adaptación del páncreas a los requerimientos de la gestación, el desencadenante de la preeclampsia puede ser una mala adaptación del sistema cardiovascular a los cambios que se producen durante el embarazo (54). En este sentido, se ha demostrado que el análisis del índice de pulsatilidad de la arteria oftálmica materna, que no puede estar relacionado con el proceso de implantación placentaria, tiene un poder predictivo de preeclampsia equiparable al de la arteria uterina (55). Este hallazgo se ha confirmado posteriormente mediante un metaanálisis (56). Ello implica que, contrariamente a lo que se creía, la alteración del análisis Doppler de la arteria uterina no refleja el grado de invasión placentaria, si no la adaptación del sistema cardiovascular materno a la gestación. Una variante de la hipótesis que centra la etiología de la preeclampsia en la susceptibilidad cardio-vascular materna se basa en que el primer cambio observable en las pacientes que desarrollarán preeclampsia es la reducción en la expresión placentaria de PP13, valorable a las 6 semanas de gestación. La reducción de PP13 en una fase inicial de la gestación afectaría negativamente la vascularización materna y la formación de vasos placentarios primarios. Estos vasos con una capacidad reducida de dilatación, necesaria para la adaptación materna a los cambios de la gestación, predispondrían al cuadro de preeclampsia. Los niveles reducidos de PP13 en una fase precoz del embarazo podrían favorecer una mayor rigidez arterial en las semanas 11-13 de gestación, que conduce a una elevación subclínica de la tensión arterial. La persistente activación endotelial materna por factores placentarios desconocidos, conduciría a la liberación aumentada de VEGF, similar a la observada en la sepsis, produciendo proteinuria y edema. Para compensar la permeabilidad capilar, formación de coágulos y adhesión leucocitaria producida por el aumento de VEGF, se estimularía la producción de sFlt-1 y consiguientemente secuestro de VEGF y PlGF libre. El aumento de sFlt-1 supondría una menor capacidad de dilatación de los vasos (hipertensión),

que, a diferencia de la sepsis, podría estimular la liberación de PP13. Al usar unas vías de señalización distintas a los factores angiogénicos, PP13, podría conseguir en algunos casos la dilatación de los vasos en presencia de niveles altos de sFlt-1.

A favor de la última teoría, hay varias evidencias:

1. Los factores angiogénicos no son específicamente expresados en la placenta: En la preeclampsia precoz la expresión placentaria de PlGF se mantiene mientras que la concentración de PlGF en suero materno se encuentra disminuida (35,36).
2. La concentración de factores angiogénicos no está relacionada con la hipoxia: Estudios comparativos en poblaciones de gestantes que habitan a diferente altitud demuestran que la oxigenación materna y placentaria no afectan los niveles sanguíneos de sFlt-1 y PlGF (57).
3. La producción placentaria de los factores angiogénicos no se correlaciona con la concentración en sangre materna de los mismos: La producción de PlGF aumenta en células endoteliales estresadas en todo el sistema cardiovascular (58). La concentración de sFlt-1 en suero está elevada en pacientes no embarazadas con insuficiencia renal crónica (59).
4. Los factores angiogénicos predicen resultados adversos en multitud de síndromes: PlGF es un marcador de cáncer de colon (60,61) y ovario (62) y el cociente sFlt-1/PlGF se usa para el seguimiento del cáncer de mama (63). sFlt-1 se usa como marcador de hipoxia en hemorragias subaracnoideas (64) marcador de severidad de sepsis (29) y pancreatitis (65). Niveles de factores angiogénicos análogos a los observados en preeclampsia (66) se han observado en mieloma (67).

Actualmente, se desconoce cuáles son los factores placentarios liberados que ocasionan el daño endotelial y si el factor primordial en el desarrollo de la preeclampsia es la insuficiencia

placentaria o la predisposición cardiovascular materna. A pesar de ello, la patogenia de la preeclampsia está claramente definida por una secuencia de sucesos:

1. Placentación anómala: Puede tratarse del suceso inicial o ser una consecuencia de la predisposición cardiovascular materna. Las anomalías en la placentación son características variables según estudios anatómo-patológicos. Es difícil su valoración en el curso de la gestación.
2. Insuficiencia placentaria: Valorada con el desequilibrio angiogénico. Imprescindible para desarrollar preeclampsia, pero variable.
3. Daño endotelial: Desencadena la expresión multisistémica materna. No disponemos de método de valoración del mismo.
4. Expresión clínica multisistémica materna: Es propiamente el cuadro de preeclampsia. Pendiente de desarrollar marcadores adecuados para su valoración.

## 1.2. Clasificación

Actualmente, la mayoría de las guías de preeclampsia no recomiendan la distinción entre preeclampsia severa y moderada, ni entre precoz y tardía a nivel clínico ya que toda paciente con preeclampsia puede agravarse de forma súbita, sin previo aviso (5). No obstante, se exponen los rasgos de severidad, para su uso a nivel de investigación. Se considera preeclampsia con rasgos de severidad, la que conlleva alguna de estas situaciones (4):

- Tensión sistólica >160 mmHg o diastólica >110 mmHg en dos determinaciones separadas como mínimo 4 horas mientras la paciente está tumbada en la cama (a menos que se haya iniciado el tratamiento médico previamente)
- Trombocitopenia (<100 000/ $\mu$ l).
- Transaminasemia (enzimas hepáticas por encima del doble de su concentración) o dolor abdominal en cuadrante superior derecho o epigástrico que no responde a tratamiento y que no es debido a un diagnóstico alternativo.

- Insuficiencia renal (concentración de creatinina  $>1.1\text{mg/dl}$  o duplicación de la concentración de creatinina en ausencia de otra enfermedad renal).
- Edema pulmonar.
- Síntomas neurológicos (se excluye hiperreflexia).
- Síntomas visuales.

Según la edad gestacional en la presentación de la preeclampsia o del parto se establece la distinción entre preeclampsia precoz y tardía. A pesar de que se han propuesto otros puntos de corte (como 32 y 36 semanas) (68), el más usado es el situado en las 34 semanas de gestación, ya que la tasa de morbilidad neonatal se reduce drásticamente alcanzada esta edad gestacional. La ISSHP en 2014 establece el punto de corte para la distinción entre preeclampsia precoz y la tardía en 34 semanas de gestación (3). Estas entidades, tienen distintos riesgos de complicaciones asociadas y la importancia de cada uno de los sucesos patogénicos es distinta. A pesar de ello, aún no está claro si son enfermedades distintas con mecanismos patogénicos diferenciados o son simplemente graduaciones de un mismo proceso subyacente (69). Tampoco se conoce adecuadamente, el papel de los marcadores de preeclampsia en la preeclampsia precoz.

### 1.3. Factores de riesgo

Según un meta-análisis los de mayor importancia son el síndrome antifosfolípido, la preeclampsia previa, la hipertensión crónica, la diabetes pregestacional, las técnicas de reproducción asistida y la IMC  $>30$  (70).

Otros factores que aumentan el riesgo de preeclampsia son las gestaciones múltiples y la nueva paternidad (primeros embarazos de una nueva pareja).

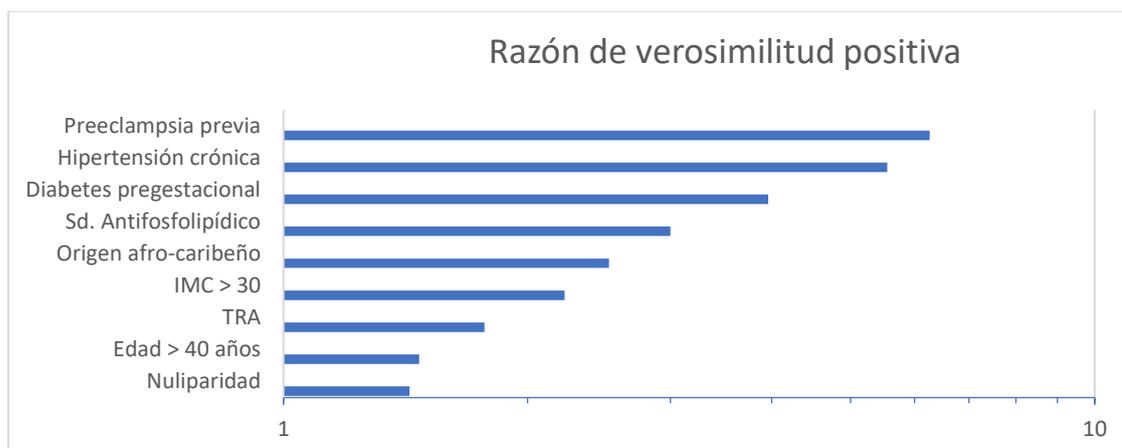
Se han encontrado diferencias entre los factores de riesgo asociados a preeclampsia precoz y tardía. La hipertensión crónica se relaciona más con la aparición de preeclampsia precoz,

mientras que el sobrepeso/obesidad, nuliparidad, y diabetes mellitus, están más relacionadas con la forma tardía (71). Este hecho apoya la hipótesis de que ambas son entidades clínicas diferenciadas, tal y como se ha mencionado previamente, aunque no se dispone de metaanálisis que analicen específicamente los factores de riesgo de la preeclampsia precoz.

*Tabla 2: Factores de riesgo de preeclampsia, según el modelo competitivo de predicción en cribado de primer trimestre (basado en una cohorte de 120,492 gestaciones) (72):*

<b>Aumentan el riesgo</b>	<b>Disminuyen el riesgo</b>
Edad	Altura
Peso	Paridad sin preeclampsia previa
Origen afro-caribeño o asiático	Intervalo entre gestaciones corto
Hipertensión crónica	
Diabetes mellitus	
LES y síndrome antifosfolipídico	
Historia familiar	
Preeclampsia previa	
Fecundación in vitro	

Figura 5: Razón de verosimilitud positiva de los factores de riesgo de preeclampsia



Representación gráfica de la razón de verosimilitud positiva de los distintos factores de mayor a menor, según el meta-análisis (70).

(69)

Tabla 3: Modificación de la razón de verosimilitud por cada uno de los factores de riesgo de preeclampsia según el meta-análisis (70). PLR (Positive Likelihood Ratio): Razón de verosimilitud positiva. NLR (Negative Likelihood Ratio): Razón de verosimilitud negativa. TRA: técnicas de reproducción asistida. IMC: índice de masa corporal

Factor de riesgo	PLR	NLR	Estudios	Población
<b>Sd. antifosfolipídico</b>	3 (No calculable)	0.998 (No calculable)	3	220156
<b>Preeclampsia previa</b>	6.26 (5.02-7.80)	0.642 (0.49-0.84)	20	3 720 885
<b>Hipertensión crónica</b>	5.55 (4.26-7.24)	0.974 (0.94-1.01)	20	6 589 661
<b>Diabetes pregestacional</b>	3.96 (3.34-4.69)	0.981 (0.93-1.04)	19	2553117
<b>TRA</b>	1.77 (1.53-2.04)	0.976 (0.93-1.03)	20	1463529
<b>IMC &gt; 30</b>	2.22(2.07-2.39)	0.737 (0.71-0.77)	40	5921559
<b>Edad &gt; 40 años</b>	1.47 (1.17-1.85)	0.917 (0.84-1.01)	16	4 260 202
<b>Nuliparidad</b>	1.43 (1.36-1.50)	0.646 (0.59-0.71)	25	2 975 158
<b>Origen afro-caribeño</b>	2.52 (2.22-2.85)	0.71 (0.65-0.77)	1	120 492
<b>(72)</b>				

## 1.4. Formas de presentación

El papel de cada suceso etiopatogénico es distinto para cada uno de las formas de presentación, según se resume en la tabla 4.

Previamente se había pensado que la invasión trofoblástica superficial era típica de presentaciones con una insuficiencia placentaria marcada (preeclampsia precoz y el RCIU). Pero, como se ha descrito previamente, el hallazgo no es específico de ningún tipo de presentación.

El estrés oxidativo es mayor en preeclampsia precoz. Y aunque está presente en las gestaciones sin patología, está correlacionado con la severidad de la preeclampsia.

*Tabla 4: Resumen del papel fisiopatológico de cada uno de los factores desencadenantes en los distintos cuadros clínicos relacionados con alteraciones de la tensión arterial durante la gestación.*

<b>Presentación</b>	<b>Invasión trofoblástica superficial</b>	<b>Estrés oxidativo</b>	<b>Desequilibrio angiogénico</b>	<b>Alteraciones cardio-vasculares</b>	<b>Proteinuria</b>
<b>Preeclampsia precoz</b>	Posible	Elevado	Elevado	Muy frecuentes	Frecuente
<b>Preeclampsia tardía</b>	Posible	Moderado	Moderado	Poco frecuentes	Frecuente
<b>Preeclampsia sobreañadida</b>	Posible	Moderado	Bajo	Desconocido	Frecuente
<b>Hipertensión gravídica</b>	Posible	Bajo	No	Escasas	No
<b>RCIU aislado</b>	Posible	Bajo	Elevado	Ausentes	No

El desequilibrio angiogénico, con predominio de los factores anti-angiogénicos, probablemente refleja el grado de insuficiencia placentaria. En el caso de gestaciones con hipertensión crónica, la disfunción endotelial preexistente predispone al desarrollo de preeclampsia (aumenta el riesgo de 3 a 5 veces), requiriendo un umbral de insuficiencia placentaria menor (73). Por ello, el desequilibrio angiogénico es menor y existe una mayor superposición entre los valores normales y patológicos. El desequilibrio angiogénico es más pronunciado en la preeclampsia precoz que en la tardía. Así mismo, tampoco discrimina la preeclampsia precoz de la insuficiencia placentaria con RCIU aislado.

Actualmente no se dispone de un marcador adecuado para valorar las alteraciones cardiovasculares, evidentes en los cuadros de preeclampsia, aunque ya se han publicado trabajos utilizando los péptidos natriuréticos y variables ecocardiográficas como posibles marcadores de una disfunción diastólica en las gestantes con preeclampsia precoz (56,74–76).

La proteinuria, presente inicialmente en el 75% de las preeclampsias (77), ya no es un requerimiento para el diagnóstico de preeclampsia. Esto es debido a que la aparición de complicaciones en la preeclampsia severa puede ser previa a la observación de la proteinuria. Según algunos autores, la proteinuria masiva (> 5 g/24horas) se asocia a un peor pronóstico neonatal y a un parto más precoz. También el índice Proteína/Creatinina >900 mg/mmol, o > 500 mg/mmol en mujeres menores de 35 años, en una muestra de orina puntual se asocia a un peor pronóstico materno (78,79). No obstante, no se recomienda basar la decisión de inducir el parto en base al grado de proteinuria.

## 1.5. Causas de morbilidad materna y perinatal

La preeclampsia puede presentar repercusiones fetales por insuficiencia placentaria y prematuridad:

- Restricción del crecimiento fetal
- Pérdida del bienestar fetal
- Desprendimiento prematuro de placenta
- Parto prematuro

Además, tiene un riesgo aumentado de complicaciones y mortalidad materna:

- Síndrome de HELLP
- Eclampsia
- Daño a otros órganos: insuficiencia renal, daño hepático, edema agudo de pulmón o tromboembolismo pulmonar, accidentes vasculares cerebrales.
- Enfermedad cardiovascular: riesgo incrementado de padecer enfermedades cardiovasculares a largo plazo
- Mortalidad materna: la preeclampsia es la primera causa de mortalidad materna en países desarrollados

## 1.6. Tratamiento y prevención

La finalización de la gestación es el único tratamiento actualmente disponible.

El ensayo clínico randomizado ASPRE(80) incluyó el 11% de las 27 000 gestantes sometidas al cribado de primer trimestre y con el riesgo más alto. De ellas, 798 gestantes fueron tratadas con 150 mg de ácido acetil-salicílico diario iniciado antes de las 16 semanas de gestación y a 822 gestantes se les administró placebo. Este ensayo demostró que la aspirina, a dosis bajas, reduce el riesgo de desarrollar preeclampsia en más de un 60% (odds ratio de 0.38 en el grupo tratado,  $p=0.004$ ). Cuando se analizó específicamente la preeclampsia precoz, no se obtuvo significación estadística.

La mejora de los métodos de control del bienestar fetal y materno hacen posible, en muchos casos, el tratamiento expectante y demorar el parto 48 horas con objeto de administrar una

tanda completa de corticoides para la maduración pulmonar del feto. Con el fin de reducir la morbilidad-mortalidad asociada a la prematuridad fetal, se ha estudiado la posibilidad de alargar la duración del embarazo con preeclampsia, reduciendo los partos pretérmino y la prematuridad de los mismos. Dos estudios en la década de los 90 demostraron mejoría en el pronóstico fetal al demorar el parto entre 7 y 15 días, sin aumento de riesgo de complicaciones maternas (81,82). En 2013 un estudio que también incluía casos de preeclampsia severa no identificó ningún beneficio fetal de alargar el embarazo afecto de preeclampsia (83). Este hallazgo negativo pudo ser debido a la población de riesgo incluida.

En la preeclampsia severa, ante la duda existente sobre la idoneidad del tratamiento expectante, se requiere vigilancia estrecha del feto y la madre, con tratamiento antihipertensivo, sulfato de magnesio endovenoso, maduración pulmonar fetal, monitorización de la frecuencia cardíaca fetal y análisis y evaluación clínica frecuente de la paciente (84). En cambio, en gestantes con estados hipertensivos del embarazo más allá de las 37 semanas de gestación se recomienda la inducción del parto ya que se asocia a un mejor pronóstico materno (85).

Por ello, las recomendaciones de ISSHP sobre el manejo de la gestante con preeclampsia son(3):

Indicaciones de parto en gestación con preeclampsia:

- a. En mujeres con preeclampsia se debería inducir el parto a las 37 semanas de gestación.
- b. En mujeres con preeclampsia entre las 34 y 37 semanas de gestación se **puede** realizar un manejo expectante
- c. En mujeres con preeclampsia por debajo de las 34 semanas de gestación se **debe** realizar un manejo expectante en un centro especializado en medicina materno-fetal considerando la necesidad del parto cuando alguna de estas situaciones aparece:

- I. Imposibilidad de controlar la tensión arterial a pesar de tratamiento antihipertensivo.
- II. Pulsioximetría materna < 90% o edema agudo de pulmón que no responde a diuréticos
- III. Deterioro progresivo de la función hepática, renal, plaquetopenia o hemólisis progresiva.
- IV. Desprendimiento placentario
- V. Flujo reverso diastólico en estudio Doppler de la arteria umbilical, *Non-Stress Test* (NST) no satisfactorio, o muerte fetal

Ni el nivel de proteinuria, ni la concentración de ácido úrico deberían usarse para indicar el parto.

En las gestantes con hipertensión crónica, hipertensión gestacional o de bata blanca debería inducirse el parto no después de las 40 semanas de gestación, o antes si no hay posibilidad de controlar la tensión arterial o desarrollan preeclampsia.

## 1.7. Cribado y predicción

### 1.7.1. Cribado en primer trimestre

Desde los años 80 está instaurada en la práctica clínica del seguimiento del embarazo el cribado de cromosopatías en el primer trimestre del embarazo, basado en la combinación de marcadores ecográficos y bioquímicos, junto con las características de la gestante para calcular el riesgo de la gestante de portar un feto con una cromosopatía, por ejemplo, el síndrome de Down (trisomía 21). Si este riesgo supera un punto de corte determinado se indica una prueba invasiva, amniocentesis o biopsia corial, para el diagnóstico de cromosopatías. La justificación de este cribado es que no estaría indicado hacer una prueba invasiva a toda la población de gestantes por el gasto que representa y porque supone un

riesgo de pérdida de la gestación que sería superior a la incidencia de esta patología. En la actualidad hay dos métodos de cálculo del riesgo. Uno basado en una regresión múltiple a partir de una población modelo, y el otro en modelos multiparamétricos Gaussianos que usan varias fuentes de información provenientes de la población estudiada y de estudios previos. Contrariamente, los modelos basados en regresión múltiple son de fácil exportación al reducirse a una fórmula matemática, mientras que los modelos Gaussianos multivariantes son matemáticamente más complejos y requieren de un software para su uso.

Siguiendo esta misma idea, se ha propuesto el cribado de preeclampsia durante el primer trimestre para establecer la indicación de prevención de preeclampsia con ácido acetil salicílico (AAS) y adecuar el seguimiento de la gestación. Para llevar a cabo este cribado se han propuesto varios marcadores:

- Características maternas: previamente descritas (ver factores de riesgo).
- $Presión\ arterial\ media = \frac{Presión\ arterial\ sistólica + 2*Presión\ arterial\ diastólica}{3}$
- Índice de pulsatilidad de la arteria uterina:
- PAPP-A: No ha demostrado mejorar los resultados del cribado de preeclampsia (86), pero al estar incluida en el cribado de cromosomopatías, también se ha incluido sin coste extra en la mayoría de modelos de cribado de preeclampsia.
- PIGF

La metodología del cálculo también se basa en regresiones múltiples o modelos Gaussianos multivariantes. El uso de modelos Gaussianos multivariantes se fundamenta en su extenso uso en el cribado de cromosomopatías, por tener una mayor adaptabilidad a la población estudiada. En el caso de la preeclampsia, ha surgido un tipo especial de regresión múltiple basado en un modelo de supervivencia con un suceso competitivo, que es el parto previo al desarrollo de preeclampsia (71).

El cribado de la preeclampsia precoz obtiene mejores resultados que la tardía.

Según Scazzocchio et al (87) si no se utiliza PIGF el porcentaje de detección de la preeclampsia precoz es de un 80.8% para un tasa de falsos positivos (TFP) del 10%. Más recientemente, se ha demostrado que la adición del PIGF al modelo predictivo puede aumentar el índice de detección en un 30% (del 64.7% al 94.1% para una TFP del 10%), según Serra et al(88). Sin embargo, sigue estando mucho más implantado el cribado sin PIGF, al no añadir costes significativos al cribado de cromosomopatías ya realizado de rutina.

A pesar de que los distintos métodos de cálculo del cribado de primer trimestre (multivariantes Gaussianos, regresiones múltiples o competitivos) obtienen porcentajes de detección similares, serían necesarios estudios comparativos.

### 1.7.2. Predicción bioquímica

El cribado de la preeclampsia pierde valor una vez que la gestante consulta por síntomas sugestivos de preeclampsia, los cuales tienen una severidad muy variable. En estos casos, lo importante es decidir sobre la necesidad de finalizar la gestación. Clásicamente, se han valorado la severidad de los síntomas y la decisión final va a depender de la experiencia del obstetra. Con el objetivo de reducir la morbilidad materna y fetal asociada, se han desarrollado modelos de predicción basados principalmente en marcadores bioquímicos.

Para poder predecir el riesgo de desarrollar complicaciones graves o fatales de la preeclampsia a corto plazo, von Dadelszen et al. usaron una combinación de marcadores clínicos y bioquímicos. Estos autores identificaron la edad gestacional, dolor torácico, disnea, saturación de oxígeno, recuento de plaquetas, creatinina y aspartato amino transferasa (AST) como predictores significativos en el modelo. Pero estos signos de alarma tardíos pueden no dejar suficiente tiempo al clínico para la intervención terapéutica. El modelo PIERS es adecuado para predecir complicaciones maternas durante las primeras 48 horas y a partir de entonces el rendimiento del test disminuye.

Durante la última década se ha hipotetizado que factores genéticos, inmunológicos y ambientales provocan la insuficiencia placentaria que conducen a la gestante a un estado anti-angiogénico, con elevación de factores anti-angiogénicos como el sFlt-1 y disminución de la concentración sérica de proteínas angiogénicas como el PIGF. De ahí que estos marcadores y especialmente el cociente sFlt-1/PIGF se han evaluado para el diagnóstico de preeclampsia y predicción del parto secundario a esta enfermedad. Zeisler H et al. (89), en el estudio observacional prospectivo PROGNOSIS (PRediction of short-term Outcome in preGNant wOmen with Suspected preeclampsia Study), se validó el uso del cociente sFlt-1/PIGF, con punto de corte de 38, como predictor útil de la ausencia de preeclampsia en una semana en gestaciones únicas con signos o síntomas sugestivos de esta patología. La posibilidad de descartar la preeclampsia en una semana es clínicamente relevante ya que una gran proporción de gestante con síntomas o signos no van a desarrollar preeclampsia y a menudo se hospitalizan hasta descartar complicaciones (90). Estos resultados se han validado externamente en una cohorte de 764 gestantes asiáticas (VPN = 98.6%) (91). Por lo contrario, una limitación de este punto de corte es el alto porcentaje de resultados falsos positivos. Para reducir la TFP asociada al cociente sFlt-1/PIGF con un punto de corte en 38, se han propuesto puntos de corte alternativos para la predicción de aparición de preeclampsia a diferentes intervalos de tiempo (ver tabla 5). Estos estudios basados únicamente en el equilibrio angiogénico no consiguen discriminar entre las pacientes que presentan insuficiencia placentaria, las que desarrollan un cuadro clínico de preeclampsia de las que únicamente presentan RCIU sin expresión clínica materna. Este hecho es importante debido a que el manejo de las dos situaciones es muy distinto. En el primer caso, se va a balancear el riesgo de complicaciones maternas con las asociadas a la prematuridad del feto, mientras que, en el segundo el objetivo es el bienestar fetal. Por este motivo, puede no ser adecuado decidir la finalización de la gestación basándonos, únicamente, en el equilibrio angiogénico. Los puntos de corte del cociente sFlt-1/PIGF superiores a 38 se han establecido mediante estudios

observacionales, sin estudios posteriores que confirmen estos hallazgos. Una validación externa reciente del punto de corte 655 en gestaciones de menos de 34 semanas de gestación no confirma la relevancia clínica del punto de corte establecido, pero muestra un rendimiento similar (tasa de detección= 56.8%, TFP=21.3%).

Otra limitación inherente a la predicción bioquímica de la preeclampsia es que se basa en estudios diseñados con una determinación por paciente. Las pacientes con sospecha de preeclampsia tienden a realizar múltiples consultas por persistencia o empeoramiento de los síntomas durante la gestación, realizando determinaciones en distintos momentos del embarazo. Considerar estas determinaciones independientes es estadísticamente incorrecto, dado que están correlacionadas al realizarse sobre una misma paciente.

Se debería justificar extensamente la idoneidad de los tests que predicen escenarios probables a las 48 horas, descritos hasta ahora, para tomar la decisión de finalizar una gestación. En ninguno de ellos se obtiene una TFP por debajo del 10 %. La decisión de finalizar una gestación prematura acarrea riesgo de complicaciones de la prematuridad en el recién nacido, con mayor probabilidad cuanto menor sea la edad gestacional. En estas situaciones se suele asumir un 5% de falsos positivos. Asumir más de un 10% debería justificarse con un adecuado estudio de riesgos y beneficios.

### 1.7.3. Cribado en segundo y tercer trimestre

Debido a que en las predicciones de preeclampsia fuera del primer trimestre no se han tenido en cuenta las características maternas hay una serie de autores que han propuesto modelos de cribado en el segundo y tercer trimestres del embarazo, en población general o con factores de riesgo de preeclampsia.

El estudio STEPS propone 3 modelos para determinar el riesgo de preeclampsia precoz en población con factores de riesgo a las 20, 24 y 28 semanas, respectivamente. Estos modelos

contienen los mismos marcadores bioquímicos y biofísicos que en el primer trimestre, incluyendo el PIGF.

También se han desarrollado modelos competitivos en la población general, para establecer el riesgo de preeclampsia tardía prematura a las 19-24 y 30-34 semanas de gestación.

El cociente sFlt-1/PIGF también ha sido utilizado para predecir la aparición de preeclampsia, combinándolo con características maternas en población general (92) y sin éstas en pacientes con sospecha clínica (89).

La relevancia clínica de la información que procede del cribado de segundo y tercer trimestre del embarazo y de las predicciones a 4 semanas vista es limitada, quedando restringida a la planificación de la necesidad de soporte neonatal y adecuación del seguimiento obstétrico.

## 1.8. Situación actual

### 1.8.1. Epidemiología

La preeclampsia es una de las primeras causas de morbilidad materna, con una incidencia entre el 2 y el 8 % de las gestaciones. Anualmente, la preeclampsia es responsable de más de 500 000 muertes neonatales y de más de 70 000 muertes maternas en todo el mundo (93). Se trata de una alteración multisistémica con manifestaciones maternas y fetales. Su severidad varía ampliamente, según la rapidez de progresión de la enfermedad. Esta entidad está asociada a un alto riesgo de parto pretérmino, retraso de crecimiento intrauterino, *abruptio placentae* (desprendimiento prematuro de placenta) y mortalidad perinatal, junto con morbi-mortalidad materna.

### 1.8.2. Guías clínicas

Las principales guías clínicas del manejo de la preeclampsia son:

- NICE 2010
- *Society of Obstetric Medicine of Australia and New Zeland (SOMANZ) 2014*
- Canadian 2014
- *America College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) 2014*
- ISSHP 2018

En una revisión de las recomendaciones de las diferentes guías (94) se destaca un amplio consenso en:

- Definición de la hipertensión, proteinuria, hipertensión crónica e hipertensión gravídica.
- Prevención de la preeclampsia con dosis bajas de aspirina y suplementos de calcio (si consumo habitual escaso).
- Tratamiento de la hipertensión severa.
- Uso de sulfato de magnesio en eclampsia y preeclampsia severa.
- Uso de corticoides durante el embarazo para maduración pulmonar fetal antes de las 34 semanas de gestación si el parto tiene que suceder antes de 7 días.
- Inducción del parto en preeclampsia a término
- Uso de oxitocina en el tercer estadio del parto

A pesar de ello, hubo nulo o escaso consenso en:

- Definición de preeclampsia.
- Objetivo tensional cuando la hipertensión no es severa.
- Planificación del parto en gestaciones con hipertensión crónica, hipertensión gravídica o preeclampsia pretérmino.
- Uso de sulfato de magnesio en preeclampsia no severa.
- Seguimiento postparto materno.

### 1.8.3. Definición de preeclampsia

Actualmente conviven dos definiciones de preeclampsia la de ACOG (2013), descrita anteriormente y la de ISSHP (2018). Las dos difieren sustancialmente, lo que complica la comparación entre estudios y la realización de meta-análisis.

La definición de la ISSHP de preeclampsia (3) es la hipertensión que se desarrolla después de las 20 semanas de gestación coexistiendo con alguna de las siguientes situaciones:

1. Proteinuria: cociente proteína/creatinina  $\geq 30$  mg/mmol (0.3 mg/mg). Destacamos que si se obtienen de 2 o más cruces de proteínas (> 30mg/dl) en una tira reactiva con una muestra urinaria puntual, se debe realizar el cociente proteína/creatinina. La presencia de  $\geq 300$  mg de proteínas en orina recogida durante 24 horas ya no es requerida.
2. Otras disfunciones de órganos maternos:
  - Insuficiencia renal (creatinina  $>90$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $>1,1$  mg/dl)
  - Daño hepático (elevación de transaminasas y/o dolor intenso en cuadrante abdominal superior derecho o epigastrio)
  - Complicaciones neurológicas (eclampsia, nivel de conciencia alterado, ceguera, embolia, clonus, cefalea intensa con hiperreflexia o escotomas visuales persistentes). No se incluye la hiperreflexia por ser inespecífica.
  - Complicaciones hematológicas (trombocitopenia, coagulación vascular diseminada hemólisis)
3. Disfunción uteroplacentaria:
  - Retraso de crecimiento intrauterino
  - Doppler de la arteria umbilical anormal
  - Muerte fetal

El RCIU se ha excluido de los criterios diagnósticos de la preeclampsia sobreañadida, ya que el RCIU habitualmente acompaña las gestaciones con hipertensión crónica.

La diferencia principal entre las definiciones de preeclampsia de la ACOG y la ISSHP es la inclusión de gestaciones con RCIU e hipertensión *de novo*, en la última. La ISSHP basándose en que la preeclampsia es, propiamente, una insuficiencia placentaria exige como único requisito para las gestaciones afectas de restricción de crecimiento intrauterino, la aparición de hipertensión *de novo* para ser consideradas afectas de preeclampsia. Estas dos situaciones son muy habituales a en la etapa final de la gestación. Además, debido a que los factores angiogénicos identifican la insuficiencia placentaria, pero no distinguen adecuadamente entre preeclampsia y RCIU aislado, una tendencia actual es a incluir el RCIU en una definición más amplia de insuficiencia placentaria que sustituiría la actual de preeclampsia. Estas opciones son contradictorias con el concepto de que la preeclampsia es una expresión clínica materna de la insuficiencia placentaria. En opinión del autor, sería más óptima la opción de investigar nuevos marcadores de esta expresión materna y establecer los determinantes de que algunas gestaciones con insuficiencia placentaria desarrollen la expresión clínica. Más importante aún es que el manejo clínico de la insuficiencia placentaria con y sin preeclampsia es radicalmente distinto. En el primero caso el principal objetivo es evitar el riesgo de complicaciones maternas, mientras que el segundo está centrado en asegurar el bienestar fetal.

En esta tesis se ha optado para usar la definición de ACOG. Como la severidad de preeclampsia puede variar ampliamente, se valoró el diagnóstico de preeclampsia que condiciona el parto a la semana de la evaluación.

#### 1.8.4. Clasificación

El manejo recomendado de estas pacientes cambia según la edad gestacional (ver la sección de tratamiento y prevención) recomendando el tratamiento expectante en gestaciones por debajo de las 34 semanas de gestación, ya que en ellas se acumula la morbilidad neonatal por la prematuridad asociada a la posible finalización de la gestación.

A pesar de ello, la Fetal Medicine Foundation, organización que ha encabezado la investigación en cribado y predicción de preeclampsia, en publicaciones del año 2016 estableció como preeclampsia precoz la que ocurre antes de las 32 semanas de gestación (95). Este cambio en el criterio imposibilita la comparación de resultados entre diferentes modelos y dificulta la cooperación multicéntrica.

Sería recomendable homogeneizar la definición de preeclampsia precoz a nivel global. En esta tesis se ha optado por establecer la frontera entre la preeclampsia precoz y tardía en la semana 34 de gestación, considerando la preeclampsia precoz como la que se presenta antes de las 34 semanas de gestación.

### 1.8.5. Modelos de cribado y predicción

El mejor rendimiento predictivo de la preeclampsia precoz se obtiene con el cribado en el primer trimestre de la gestación y en segundo lugar con el cocientesFlt-1/PIGF con el punto de corte 38. No existen métodos que consideren las características maternas para ajustar el riesgo a priori en pacientes con sospecha clínica de preeclampsia. Este ajuste solamente se realiza en las pacientes que se sometan a cribado, ya sea población general o seleccionada por criterios de riesgo.

La consulta reiterada por sospecha de preeclampsia es frecuente, ya sea por persistencia de síntomas o empeoramiento de los mismos. A pesar de ello, ninguno de los métodos actualmente disponibles de predicción de preeclampsia permite la evaluación repetida del riesgo.

Actualmente, no disponemos de ninguna herramienta que nos indique qué gestaciones afectas de preeclampsia debemos finalizar para reducir la morbilidad y mortalidad materna y neonatal.

*Tabla 5: Comparación de los múltiples modelos de cribado y predicción de preeclampsia.*

Modelo	R <sub>a priori</sub>	Predicción	Resultados	Tratamiento	Población
<b>Cribado primer trimestre</b>	Sí	PE precoz(88,96)	S= 94-96.4% TFP= 10%	Prevención	General
		PE pretérmino (96)	S= 76.6% TFP= 10%	AAS baja dosis	
<b>Cribado 2º y 3er trimestre</b>	Sí	PE precoz(97)	S= 83% TFP= 10%	No	General o de riesgo
		PE pretérmino (98)	S= 85% TFP= 10%		
<b>Cociente sFlt-1/PIGF</b>	No	≤ 38 (89) PE en 1 semana	VPN= 99.3 % TFP= 21.7 %	Evita ingresos	Sintomática
		> 85 (99,100) parto 2 semanas	Desconocido	No	< 34 sg
		> 655 (101) parto < 48 horas	S= 31.6 % TFP= 16.1 %	No	PE < 34 SG
		> 210 parto < 48 horas	S= 29.4 % TFP= 14.8 %	No	PE 34-37 SG
<b>PIERS (102)</b>	No	Complicaciones maternas <48 horas	S= 75.5 % TFP= 13.1 %	Parto	PE hospitalizadas
<b>PREP (103)</b>	No	Complicaciones maternas <48 horas	Desconocido	Parto	PE precoz hospitalizada
		Complicaciones maternas al alta	Desconocido	Parto	PE precoz hospitalizada

## 1.9. Marcadores bioquímicos candidatos

La OMS establece que los marcadores bioquímicos deben cumplir tres requisitos:

- Ser específicos de una enfermedad bien definida con una prevalencia conocida.
- Ser usados en una enfermedad en la que la información que proporcionen pueda mejorar el pronóstico o disminuir la severidad de la misma.
- Ser coste efectivos.

Se realizó una revisión en 2004 que estableció que, en ese momento, no había ningún marcador bioquímico de preeclampsia que cumpliera estos requisitos (104).

### 1.9.1. Factores angiogénicos

Los niveles maternos de factores angiogénicos se han establecido como factores pronósticos en la PE. Los factores angiogénicos incluyen el PlGF, s-Flt-1 y el cociente sFlt-1/PlGF. Estos factores han mostrado una buena capacidad de descartar complicaciones como el desarrollo de preeclampsia (89), el edema pulmonar agudo, el fracaso renal agudo, hemorragia cerebral y muerte perinatal o intrauterina entre otros (105). Pero al mismo tiempo, han mostrado una moderada capacidad de predicción del desarrollo de las mismas (89,106).

### 1.9.2. NT-proBNP

La disfunción endotelial, que es el principal hallazgo en las pacientes con preeclampsia, dificulta los cambios hemodinámicos fisiológicos que ocurren durante la gestación. Como consecuencia, las gestantes con preeclampsia sufren alteraciones cardiovasculares como hipertensión y aumento de la resistencia vascular periférica, vasoconstricción y disminución del volumen plasmático. Ante este escenario estresante, el corazón responde produciendo marcadores de daño cardíaco, que se han propuesto como herramientas útiles en la evaluación de la preeclampsia. En particular, la prohormona N-terminal del péptido

natriurético tipo B (NT-proBNP), habitualmente usado en el diagnóstico y pronóstico del fallo cardíaco, muestra concentraciones más elevadas en gestaciones con preeclampsia que en gestaciones sin esta complicación.

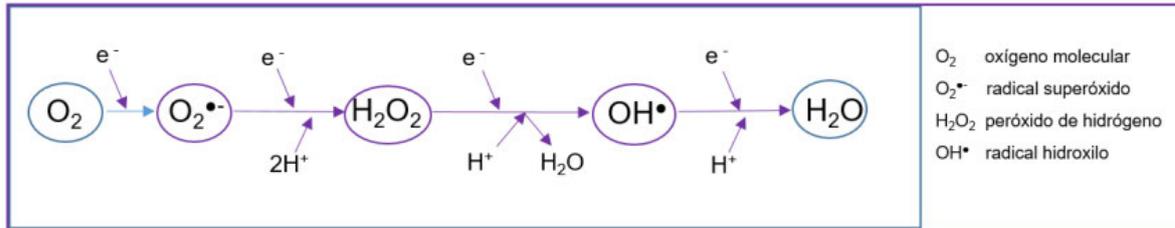
### 1.9.3. Estrés oxidativo y ácido úrico

#### 1.9.3.1. Estrés oxidativo

Un radical libre es un átomo, molécula, o compuesto altamente inestable debido a que en su estructura atómica o molecular tiene en su orbital más externo uno o más electrones desapareados. Esta capa de electrones incompleta es la que le confiere su alta reactividad. En los seres vivos los radicales libres se genera a partir del oxígeno y el nitrógeno.

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) participa en la transferencia de electrones de alta energía durante la fosforilación oxidativa que genera adenosina-5-trifosfato (ATP). Esta molécula suministra energía para múltiples reacciones del metabolismo celular. Durante el proceso de fosforilación oxidativa, en el que  $O_2$  es reducido totalmente a agua (figura 8), se generan productos intermedios como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido, denominados conjuntamente especies reactivas de oxígeno (ERO). La principal fuente de ERO es la cadena respiratoria mitocondrial. Estas ERO tienen la capacidad de reaccionar con mucha facilidad con cualquier sustancia orgánica, pudiendo alterar proteínas, lípidos o cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN). El proceso de modificación de moléculas cercanas por parte de las ERO se conoce como daño oxidativo.

Figura 6: Origen de las especies reactivas de oxígeno.



Reducción total del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa. Con el aporte seriado de cuatro electrones, el  $O_2$  es totalmente reducido hasta agua, producto final en la cadena de transporte electrónico.

Los radicales libres también cumplen un papel en procesos fisiológicos. Por ello, es necesario un nivel mínimo de ERO para el adecuado funcionamiento celular. El desequilibrio entre los ERO y los sistemas antioxidantes de que disponemos, por exceso de los primeros, se conoce como estrés oxidativo.

La producción de ERO aumenta durante el embarazo debido al aumento de demanda de oxígeno. En la preeclampsia, la invasión trofoblástica superficial produce una reducción de la perfusión placentaria, que conlleva un entorno placentario hipóxico con estrés oxidativo. Los tejidos sometidos a estrés oxidativo sufren modificaciones conocidas como daño oxidativo. Este daño oxidativo junto con la inflamación dan como resultado la disfunción endotelial (20).

### 1.9.3.2. Ácido úrico

El ácido úrico también ha sido estudiado como predictor de preeclampsia. Es bien conocido, que el ácido úrico está consistentemente elevado en la preeclampsia, a pesar de que las razones para este incremento no se conocen con detalle. La disminución del filtrado glomerular, reabsorción aumentada y secreción disminuida en el túbulo proximal están involucrados en este hecho. Pero estas adaptaciones renales no explican de forma completa el grado de hiperuricemia observado. Por eso, otros mecanismos como la isquemia placentaria,

daño tisular y estrés oxidativo deben estar implicados. El ácido úrico es uno de los antioxidantes no enzimáticos en humanos.

## 1.10. Tratamiento estadístico de los marcadores pronósticos

Los marcadores pronósticos de preeclampsia son marcadores que se modifican justo antes de que ocurra el suceso que pretenden predecir. Esta característica dificulta el tratamiento estadístico en la evaluación de estos marcadores. El valor clínico de estos marcadores permitiendo medidas repetidas no ha sido investigado específicamente. En esta tesis se ha valorado la necesidad de finalización del embarazo en una semana debido a la preeclampsia, siempre considerando que sea diagnosticada antes de las 37 semanas de gestación.

Tanto NT-proBNP como el ácido úrico, contrariamente al cociente sFlt-1/PlGF, son marcadores que aumentan su concentración poco antes del parto debido a la preeclampsia. Como consecuencia de este hecho, solo los estudios longitudinales que permiten más de una determinación por paciente son capaces de valorar su papel en la predicción del parto debido a preeclampsia. Otros diseños requieren de una muestra mucho mayor o no son reproducibles en la práctica clínica al seleccionar a posteriori la muestra más próxima al suceso de interés. Consecuentemente, algunos autores como Verlohren et al (107) no han sido concluyentes al analizar la relación entre NT-proBNP y preeclampsia usando un modelo de regresión tradicional (una determinación por paciente).

Debido a que las pacientes consultan ante la aparición de síntomas sospechosos de preeclampsia, y no de forma programada, habrá pacientes con mayor número de evaluaciones que otras y el intervalo entre las mismas será variable. En esta situación tampoco son adecuados modelos estadísticos más habituales, como ANOVA de medidas repetidas.

Los únicos modelos que permiten valoración de muestras repetidas con número de muestras e intervalo entre ellas variable son los modelos *Generalized Estimating Equations* (GEE) y

modelos mixtos. Tanto los primeros como los segundos, tienen en cuenta la correlación existente entre las determinaciones de un mismo individuo. En el primer caso el modelo ofrece una estimación del riesgo a nivel poblacional, mientras que en el segundo caso estima el riesgo personal introduciendo un factor aleatorio a la predicción.

El objetivo de esta tesis es el desarrollo de una herramienta de predicción pronóstica de la preeclampsia basado en marcadores bioquímicos, que permita la evaluación repetida del riesgo

## 2. Hipótesis

### 2.1. Justificación

A pesar de los avances en el cribado y predicción de la preeclampsia con la incorporación de los factores angiogénicos en la práctica clínica y la prevención con ácido acetil salicílico a bajas dosis, aún no se comprenden completamente los mecanismos fisiopatológicos implicados en esta enfermedad. Debido a que la definición, basada en criterios clínicos, incluye cuadros con severidades muy dispares y el único tratamiento para evitar complicaciones es la finalización de la gestación, urge ofrecer al clínico una herramienta predictiva del pronóstico de las gestaciones con sospecha de preeclampsia. De esta forma, dispondría de una mayor información para ponderar el riesgo de complicaciones maternas con la prematuridad fetal asociada a la finalización de la gestación. Asimismo, permitiría también homogeneizar el manejo de estas pacientes que, actualmente, se hace en base a la experiencia clínica lo que le confiere una tremenda heterogeneidad. Este, es sin duda, un gran desafío, contemplado en esta tesis cuya pretensión es aportar información en esa dirección, deseando que mediante la cooperación se consiga avanzar en este camino.

Los factores angiogénicos han permitido definir un grupo de gestaciones con sospecha de preeclampsia y bajo riesgo de complicaciones. Pero, asimismo, presentan limitaciones en la predicción de la preeclampsia, pues no son más que un reflejo de la disfunción placentaria existente y no permiten establecer el pronóstico de la enfermedad por sí solos, ni distinguen claramente los casos de preeclampsia de otras patologías placentarias.

El desarrollo de nuevos marcadores relacionados con el pronóstico de la preeclampsia y la aplicación de aproximaciones estadísticas, no habituales en esta área, podría abrir nuevas líneas de investigación para mejorar la atención médica de estas gestaciones. A este respecto, el grupo del Dr. Álvarez lleva investigando en el campo de la preeclampsia desde el año 2012, y

fruto de ello son los distintos artículos publicados desde entonces. En esta búsqueda, se ha centrado la atención en el NT-proBNP y el ácido úrico, por varios motivos. Por un lado, a pesar de que múltiples estudios describen una correlación de estos con la preeclampsia, ninguno ha conseguido desarrollarlos como marcadores. Además, ninguno de estos marcadores tiene origen placentario de forma predominante, por lo que pueden reflejar cambios maternos correlacionados con la severidad de la preeclampsia. Por este motivo se han usado métodos de análisis de estudios longitudinales que permiten el tratamiento de variables con medidas repetidas y la identificación de marcadores pronósticos, que de otra manera podría no ser posible. También se ha valorado su combinación con los factores angiogénicos.

## 2.2. Hipótesis

Existen indicios de que las concentraciones séricas de los factores angiogénicos (sFlt-1 y PlGF), el NT-proBNP y el ácido úrico puedan estar alterados en relación al diagnóstico de la preeclampsia. Por ello, su determinación tanto en gestaciones sanas como en gestaciones con preeclampsia u otras patologías obstétricas sería útil para evaluar su potencial como marcadores pronósticos de preeclampsia.

1. El cociente sFlt-1/PlGF menor o igual a 38 descarta adecuadamente la necesidad de finalizar la gestación debido a preeclampsia durante la siguiente semana a la extracción de la muestra de sangre para la determinación de los biomarcadores
2. La determinación repetida de NT-proBNP o ácido úrico o ambos añadidos al cociente sFlt-1/PlGF nos mejoran la predicción de parto con preeclampsia pretérmino (antes de la semana 37) a corto plazo (1 semana), comparados con usar solo el cociente sFlt-1/PlGF, cuando éste es superior a 38.
3. La determinación repetida de NT-proBNP o ácido úrico o ambos añadidos al cociente sFlt-1/PlGF nos mejoran la predicción de parto con preeclampsia precoz (antes de la

semana 34) a corto plazo (1 semana), comparados con usar solo el cociente sFlt-1/PIGF, cuando éste es superior a 38.

## 2.3. Objetivos

### Primarios:

1. Evaluar la validez externa de los resultados del estudio PROGNOSIS en las primeras determinaciones, tomando como suceso a analizar la necesidad de finalizar la gestación debido a preeclampsia durante la siguiente semana a la primera determinación. Si se confirma esta hipótesis, los próximos objetivos se centrarán en las gestantes con el cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.
2. Evaluar el papel de los marcadores (cociente sFlt-1/PIGF, NT-proBNP y ácido úrico) en la predicción de parto con preeclampsia a la semana, en determinaciones repetidas. Y comparar con uso exclusivo del cociente sFlt-1/PIGF.
3. Evaluar el papel de los marcadores (sFlt-1, PIGF, NT-proBNP y ácido úrico) en la predicción de parto con preeclampsia precoz (antes de la semana 34) a la semana, en determinaciones repetidas. Y comparar con uso exclusivo del cociente sFlt-1/PIGF.

### Secundarios:

1. Comparar el comportamiento de los marcadores (cociente sFlt-1/PIGF, NT-proBNP y ácido úrico) en retraso de crecimiento intrauterino aislado con las que presentan preeclampsia con parto pretérmino y gestaciones sin ninguna de estas circunstancias en distintos momentos del embarazo.
2. Comparar el comportamiento de los marcadores (cociente sFlt-1/PIGF, NT-proBNP y ácido úrico) en hipertensión crónica con y sin preeclampsia con parto pretérmino en las últimas determinaciones.

### Terciario:

1. Crear calculadora de riesgo de parto con preeclampsia a la semana y establecer punto de corte idóneo para considerar paciente de riesgo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Artículo 1

Enric Sabrià, Paloma Lequerica-Fernández, Paula Lafuente Ganuza, Edwin Eguia Ángeles, Ana I. Escudero, Eduardo Martínez-Morillo and Francisco V. Álvarez\*

## Use of the sFlt-1/PlGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible?

<https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0443>

Received May 19, 2017; accepted July 24, 2017

### Abstract

**Background:** Soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) to placental growth factor (PlGF) ratio has been proven to predict preeclampsia occurrence.

**Methods:** Blood samples from 195 pregnant women with suspected preeclampsia were obtained at obstetric triage admission or from the high-risk pregnancy outpatient office. Serum PlGF and sFlt-1 were measured by an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) on the immunoanalyser Cobas e601 (Roche Diagnostics) and the corresponding ratio was calculated. Final outcomes were reviewed by an independent obstetrician. Only the first determination was considered.

**Results:** A sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower ruled out the need for pregnancy termination due to preeclampsia in the subsequent week with a negative predictive value (NPV) of 99.1% (sensitivity 97.1% and specificity 67.5%). None of the 76 pregnancies with first determination of an sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower between 24 and 34 weeks of gestation delivered due to early-onset preeclampsia. Positive likelihood ratio (PLR) of an sFlt-1/PlGF ratio above 38 for prediction of pregnancy termination due to preeclampsia within 4 weeks is analogous to published evidence.

\*Corresponding author: Francisco V. Álvarez, Servicio de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011, Oviedo, Spain; Biochemistry Service, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; E-mail: falvarezmen@gmail.com; and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

Enric Sabrià: Obstetric and Gynecology Service, Hospital-Residència Sant Camil, Barcelona, Spain

Paloma Lequerica-Fernández, Paula Lafuente Ganuza, Edwin Eguia Ángeles and Eduardo Martínez-Morillo: Biochemistry Service, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

Ana I. Escudero: Obstetric and Gynecology Service, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

**Conclusions:** Between 24 and 34 weeks of gestation, no subsequent determination was needed to completely rule out early-onset preeclampsia when the first sFlt-1/PlGF ratio determination was 38 or lower in singleton pregnancies with signs or symptoms of this syndrome. These findings, if confirmed, will reduce costs and facilitate the implementation of the sFlt-1/PlGF ratio in women with clinical suspicion of preeclampsia in the third trimester.

**Keywords:** external validity; likelihood ratio; preeclampsia prediction; prognosis study; sFlt-1/PlGF ratio; spectrum bias.

### Introduction

Preeclampsia is a leading cause of maternal morbidity and mortality worldwide, complicating 2%–8% of pregnancies [1]. It is a multisystemic disorder with both maternal and fetal manifestations. Preeclampsia is defined as the new onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation [2]. This disorder is associated with a high risk of iatrogenic preterm delivery, intrauterine growth restriction, placental abruption, and perinatal mortality, along with maternal morbidity and mortality [3–5].

Its pathophysiology is incompletely understood up to now. Taylor and Roberts posited that a dysfunctional placenta releases “toxic” factors into the maternal circulation that trigger the clinical syndrome of preeclampsia [6]. Placental insufficiency is both necessary and sufficient to cause the disease, and delivery is the only treatment [7]. Over the last decade, preeclampsia has been recognized as an antiangiogenic state [8]. In preeclampsia, the placenta shows overexpression of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sEng). Their concentrations are increased in the serum of women with preeclampsia weeks before the appearance of clinical manifestations, and they correlate with disease severity [9].

Importantly, sFlt-1 overexpression in pregnant rodents is sufficient to induce the hallmarks of preeclampsia: hypertension and proteinuria [10].

Although high levels of sFlt-1 and sEng are widely recognized as contributors to the pathogenesis of the

disease, the upstream mechanisms of placental damage remain to be elicited. Several mechanisms have been proposed, such as placental hypoxia, oxidative stress, endoplasmic stress, inflammation, etc. [11].

It is well established that angiogenic (PlGF) and antiangiogenic factors (sFlt-1) are involved in the pathophysiology of preeclampsia [10]. Therefore, both factors have been reported as potential biomarkers of the disease, although the sFlt-1/PlGF ratio shows better accuracy than either determination alone [12].

Initially, a unique cutoff of 85 for the sFlt-1/PlGF ratio to diagnose preeclampsia was proposed [12–16]. Later on, our group published lower cutoff points. In early gestational ages (<34 weeks of gestation), an sFlt-1/PlGF ratio of 23 or lower ruling out early-onset preeclampsia obtained a higher sensitivity (92%) at still reasonable specificity (81%) [17]. After 34 weeks of gestation, best performance was obtained at a cutoff of 45 (83.7% sensitivity and 72.6% specificity) [14]. Simultaneous to our previous paper, a ratio cutoff point of 33 was proposed to exclude preeclampsia regardless of the gestational age, and 85 or 110 to assess the diagnosis of early- or late-onset preeclampsia, respectively [18].

Since January 2016, the sFlt-1/PlGF ratio cutoff point of 38 for ruling out preeclampsia within 1 week in women with suspected disease is accepted [19]. However, the predictive value of the sFlt-1/PlGF ratio for early onset preeclampsia has not been specifically examined in the PROGNOSIS study [20].

Women with suggestive symptoms or signs are often hospitalized until preeclampsia and adverse outcomes have been ruled out. Although no preventive or therapeutic strategy is yet available, clinical experience suggests that early detection and monitoring are beneficial [21].

Even though diagnostic accuracy plays a central role in the evaluation of medical diagnostic tests, reproducibility evaluation studies of diagnostic tests are scarce. The major reason for that is that the most clinically relevant measures, the post-test probabilities (positive and negative predictive values), vary with the disease's prevalence [22]. The performance characteristics of the test (sensitivity, specificity, and likelihood ratio) are often considered independent from the disease's prevalence [23]. However, patient's characteristics or features and severity of the disease can influence sensitivity and specificity of a diagnostic test [24]. This is defined as the spectrum effect and can lead to spectrum bias when subgroup variations in sensitivity and specificity also affect likelihood ratios and, thus, post-test probabilities [25].

The objective of our study was to assess the external validity of the sFlt-1/PlGF ratio's published performance

in predicting early-onset preeclampsia requiring delivery using the cutoff of 38 on primary determinations in pregnant woman that come to the Emergency Department of our hospital with signs and/or symptoms of preeclampsia, any time within 24 and 36 + 6 weeks of gestation.

## Materials and methods

### Patients

A retrospective cohort study was performed in pregnant women admitted to the obstetric emergency department, or at the high-risk pregnancy outpatient office, either with signs and/or symptoms of potential preeclampsia. A total of 344 women were enrolled at the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) between January 2015 and December 2016. Inclusion criteria were high blood pressure, proteinuria, abnormal uterine artery Doppler, headache that did not respond to analgesic, visual symptoms (blurry vision or flashing lights), and/or severe edema affecting hands, feet or face, gestational age at arrival between 24 and 36 + 6 weeks of gestation

Exclusion criteria were: multiple pregnancies (15 pregnancies), patients outside the range 24 to 36 + 6 weeks of gestation (125 pregnancies), lost to follow-up (nine pregnancies). Finally, 195 pregnancies were analyzed. Only the first sample of patients taken was used in this study.

As the definition of preeclampsia includes a wide range of severity, we did not state preeclampsia diagnosis as an endpoint. Instead, we assessed severity of preeclampsia considering the need for pregnancy termination due to preeclampsia. Therefore, the evaluated outcome was diagnosis of preeclampsia leading to delivery between 1 and 4 weeks after the assessment [26].

Women who had manifest preeclampsia or a confirmed diagnosis of HELLP syndrome were not excluded, as this would reduce external validity of this study, which assesses the need for delivery due to preeclampsia.

Indication of pregnancy termination was decided by the obstetric team following Spanish scientific society recommendations (Table 1).

**Table 1:** Summary of pregnancy termination indications in preeclampsia according to the “Spanish Society of Obstetrics and Gynecology (SEGO)”.

Indications for pregnancy termination in preeclampsia (SEGO)
Mild preeclampsia at term
Severe preeclampsia after 34 weeks of gestation
Suspicion of fetal distress
Hypertension resistant to medical treatment
Progressive thrombocytopenia
Progressive oliguria
Progressive worsening of liver function
Prodromal symptoms of eclamptic seizure
Severe maternal complications (cerebral hemorrhage, pulmonary edema, placental abruption, liver rupture, coagulopathy)

The laboratory staffs were blinded to subjects' clinical information as well as clinicians for taking decisions based upon laboratory results. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Asturias and written informed consent was obtained from each patient.

### Analytical assay

At the emergency admission or at the outpatient office, blood samples were collected and drawn into serum-separator tubes and immediately centrifuged at 1200 g for 10 min. PlGF and sFlt-1 concentrations were measured by an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA, Elecsys PlGF and sFlt-1) on an automated immunoanalyzer Cobas e601 (Roche Diagnostics, Germany) showing a turnaround time of 18 min per assay. The measuring intervals were 3–10,000 pg/mL for PlGF and 10–85,000 pg/mL for sFlt-1, and the limits of quantitation were 10 pg/mL and 15 pg/mL, respectively. The PlGF inter-assay coefficient of variation was 4.1% at a mean concentration of 96 pg/mL (PeciControl Multimarker 1, Roche Diagnostics, Germany) and 3.6% at 973 pg/mL (PeciControl Multimarker 1) and 3.8% at 1020 pg/mL (PeciControl Multimarker 2). No specific interferences have been reported.

### Diagnostic criteria

Preeclampsia was diagnosed according to the definition of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) [2]. Hypertension was defined as blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg on two separate occasions 24 or more hours apart. The proteinuria definition includes either  $\geq 300$  mg of protein per 24-h urine collection or ratio of protein/creatinine  $\geq 30$  mg/mmol. Note that 2+ protein or greater on dipstick urinalysis and protein  $\geq 30$  mg/dL in a spot urine sample were not considered. To be considered early-onset, preeclampsia or HELLP syndrome had to occur before 34+0 weeks of pregnancy.

HELLP syndrome is characterized by hemolysis (LDH  $> 600$  IU/L), elevated liver enzyme levels (AST  $> 70$  IU/L), and low platelet count ( $< 100,000/\mu\text{L}$ ).

Intrauterine growth restriction (IUGR) defined as estimated fetal weight below the 10th percentile due to a pathological process that inhibits expression of the normal growth potential. This pathological process must be demonstrated after 22 weeks of gestation with oligohydramnios (amniotic fluid index  $< 10$ th percentile) or Doppler ultrasonography pulsatility index of the umbilical artery  $> 95$ th percentile.

### Statistical analysis

In order to assess the presence of spectrum bias (likelihood ratio variation), likelihood ratios of the test with confidence intervals have been calculated as follows:

$$\text{Positive likelihood ratio (PLR)} = \frac{\text{Sensitivity}}{1 - \text{Specificity}} \text{ and}$$

$$\text{Negative likelihood ratio (NLR)} = \frac{1 - \text{Sensitivity}}{\text{Specificity}}.$$

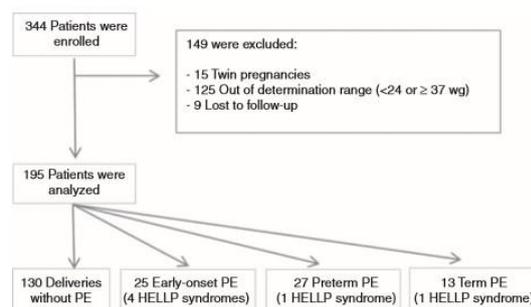
This is the probability of a person who has the disease testing positive or negative, respectively, compared to the probability of that same result in a patient without the disease. Statistical significance was defined as p-value of  $< 0.05$ .

We assessed reproducibility of the PROGNOSIS study comparing NLR for the rule-out, and PLR for the rule-in. However, we did assess other proposed cutoff points [27], when our study design permitted the comparison.

## Results

### Baseline characteristics

A total of 344 women with signs and symptoms of preeclampsia were enrolled (Figure 1); of these, 195 women were suitable for analysis. Figure 1 shows details of the inclusion-exclusion process. One hundred and thirty-four pregnancies did not meet inclusion criteria, mostly because of determinations outside the studied period (24 to 36+6 weeks of gestation). The incidence of delivery due to preeclampsia or HELLP syndrome in this group of pregnancies was 33.3% (65/195). Of these, 21 were due to early-onset preeclampsia and four due to HELLP syndrome before 34 weeks of gestation, and 38 were due to late-onset preeclampsia and two due to HELLP syndromes at 34 weeks of gestation or later. Out of the 15 excluded twin pregnancies, 10 delivered due to preeclampsia and one delivered due to HELLP syndrome within 34 to 36+6 weeks of gestation. However, there was neither early-onset preeclampsia nor HELLP syndrome before 34 weeks of gestation in twin pregnancies. The demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 2. Age, gestational age, body-mass index before pregnancy, diabetes, and in vitro fertilization did not differ significantly between participants in whom preeclampsia developed and those in whom it did not.



**Figure 1:** Inclusion and exclusion criteria with outcome at delivery. PE, preeclampsia; HELLP, hemolysis, elevated liver enzymes low platelets.

**Table 2:** Demographic and clinical characteristics of the study population in pregnancies with delivery without preeclampsia (No PE) and affected pregnancies (PE).

	Mean (SD)		p-Value
	No PE	PE+HELLP sd	
n (%)	130 (66.7)	65 (33.3)	
Maternal age at sampling time, years	35 (5)	34 (6)	0.65
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30.2 (4.5)	30.6 (5.0)	0.14
Diabetes, n (%)	14 (10.8)	8 (12.3)	0.75
Nuliparity, n (%)	73 (56.1)	47 (72.3)	<b>0.03*</b>
<i>In vitro</i> fertilization, n (%)	8 (6.1)	3 (4.6)	0.67
Data at sampling time			
Gestational age, weeks	31 (4)	32 (3)	0.07
Diastolic blood pressure, mmHg	80 (11)	91 (11)	<b>&lt;0.01*</b>
Systolic blood pressure, mmHg	129 (24)	152 (19)	<b>&lt;0.01*</b>
Proteinuria, n (%)	7 (5.3)	33 (50.7)	<b>&lt;0.01*</b>
ALT, U/L	23 (38)	25 (44)	0.63
AST, U/L	25 (32)	25 (17)	0.20
Uric acid, μmol/L	238 (65)	321 (107)	<b>&lt;0.01*</b>
LDH, U/L	198 (34)	251 (99)	<b>0.03*</b>
Platelet count, ×10 <sup>9</sup> /L	239 (63)	192 (60)	<b>&lt;0.01*</b>
Data at delivery			
Gestational age, weeks	37 (3)	34 (3)	<b>&lt;0.01*</b>
Diastolic blood pressure, mmHg	80 (13)	87 (12)	<b>&lt;0.01*</b>
Systolic blood pressure, mmHg	128 (15)	150 (22)	<b>&lt;0.01*</b>
Proteinuria, n (%)	10 (7.7)	63 (96.9)	<b>&lt;0.01*</b>
Reason for suspected preeclampsia <sup>b</sup>			
New-onset hypertension, n (%)	56(43.1)	15 (23.1)	<b>&lt;0.01*</b>
Chronic hypertension, n (%)	5 (3.8)	7 (10.8)	0.05
New-onset proteinuria, n (%)	7 (5.4)	33 (50.8)	<b>&lt;0.01*</b>
Prior PE, n (%)	9 (6.9)	2 (3.1)	0.28
IUGR, n (%)	24 (18.4)	11 (16.9)	0.79
Symptoms, n (%)	3 (2.3)	1 (1.5)	0.71
Abnormal uterine perfusion, n (%)	38 (29.2)	10 (15.3)	<b>0.03*</b>

Significant differences between the two groups ( $\alpha=0.05$ ) are indicated with “\*”. p-Values were calculated with the use of the Student’s t-test for continuous variables and Fisher’s exact test for categorical variables. The body mass index (BMI) is the weight in kilograms divided by the square of the height in meters. <sup>b</sup>There may have been more than one reason for suspected preeclampsia. SD, standard deviation; sd, syndrome. p-Values lower than 0.05 (considered statistically significant) are highlighted in bold font.

## Delivery with preeclampsia

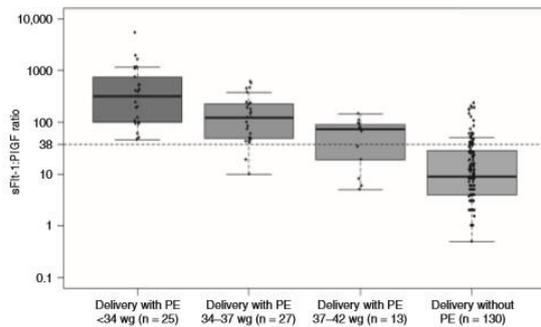
Pregnancies terminated due to early-onset preeclampsia or HELLP syndrome (n=25) had a significantly higher median sFlt-1/PlGF ratio than pregnancies with preeclampsia or HELLP syndrome and delivery between 34 and 37 weeks of gestation (n=27): 323 (IQR 97–928) vs. 124 (IQR 48–231). These last ones had a significantly higher median sFlt-1/PlGF ratio than pregnancies with preeclampsia or HELLP syndrome and term delivery (n=13): 73 (IQR 13.5–94.5). And these last ones had a significantly higher median sFlt-1/PlGF ratio than pregnancies without preeclampsia or HELLP syndrome (n=130): 9 (IQR 4–29) (Figure 2).

Comparing with participants whose pregnancies continued or who delivered without preeclampsia, the

median sFlt-1/PlGF ratio was elevated among participants who delivered due to preeclampsia or HELLP syndrome within 1 week (191 vs. 13.5) and within 4 weeks (168.5 vs. 10), with statistically significant differences (Figure 3).

## Preterm delivery

Considering pregnancies without preeclampsia, patients who developed IUGR and delivered prematurely (n=12) had a significantly higher median sFlt-1/PlGF ratio than those with IUGR and term delivery (n=8): 104 (IQR 17.25–193.25) vs. 8 (IQR 5–38.25). No differences were observed between pregnancies that developed IUGR and delivered at term and pregnancies that did not develop IUGR (n=110). Likewise, preterm deliveries without preeclampsia or



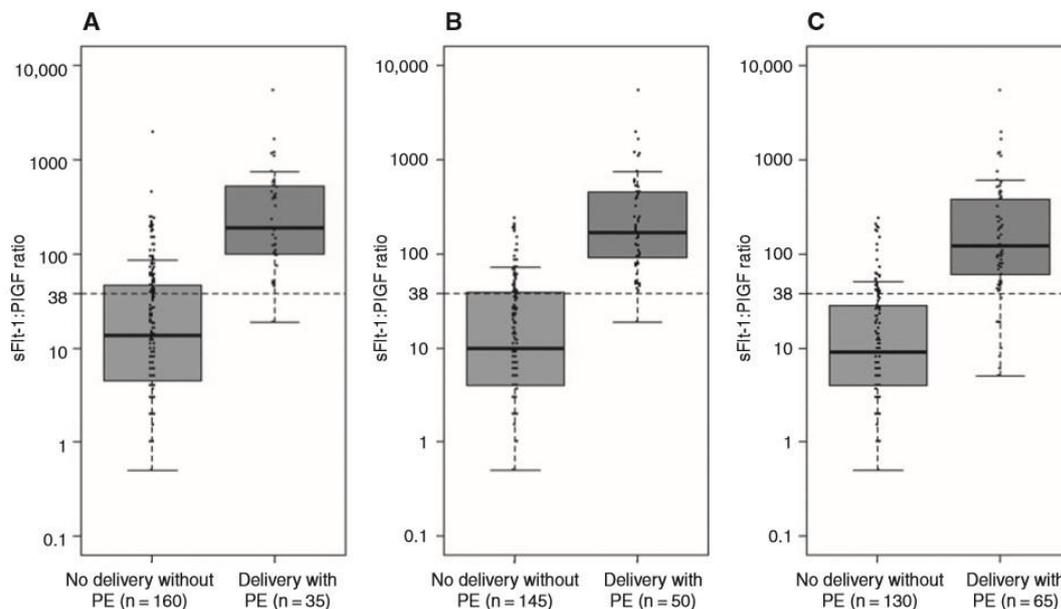
**Figure 2:** sFlt-1/PlGF ratio boxplots (in logarithmic scale) for outcome at delivery from 195 pregnancies. The boxes represent the interquartile range, the band within the box represents the median value and the whiskers represent values that are 1.5 times the interquartile range. PE <34 weeks of gestation: refers to delivery due to preeclampsia prior to 34 weeks of gestation. Horizontal dotted line represents the cutoff point of 38. Each outcome had significant higher sFlt-1/PlGF ratio than the subsequent outcome. None of the 25 pregnancies with delivery due to early onset preeclampsia (prior to 34 weeks of gestation) had sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower. PE, preeclampsia; wg, weeks of gestation.

IUGR (n=20) had a significantly higher median sFlt-1/PlGF ratio than term deliveries without preeclampsia or IUGR (n=90) ( $p < 0.01$ ): 19.5 IQR (7.25–40.75) vs. 6 IQR [3–22] (Figure 4).

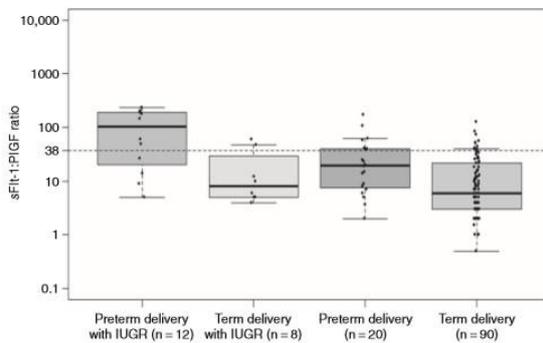
**Test performance**

We confirmed that the sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower to rule out pregnancy termination due to preeclampsia in the subsequent week had a high negative predictive value (NPV) of 99.1% (95% CI: 96.8–100) (99.3% in the PROGNOSIS study) even with a higher prevalence of pregnancy termination due to preeclampsia in one week (17.9% vs. 2.7% in the PROGNOSIS study). Comparison of NLR to predict pregnancy termination due to preeclampsia in 1 week shows that despite higher prevalence of preeclampsia, NLR remains low, even lower than in the original PROGNOSIS study (Table 3).

None of the 76 pregnancies with first determination of a sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower between 24



**Figure 3:** sFlt-1/PlGF ratio boxplots (in logarithmic scale) for preeclampsia at delivery in 1 week (A) and four weeks after the assessment (B) and overall (C). The boxes represent the interquartile range, the band within the box represents the median value and the whiskers represent values that are 1.5 times the interquartile range. Horizontal dotted line represents the cutoff point of 38. Deliveries with preeclampsia had significant higher sFlt-1/PlGF ratio than pregnancies without delivery or preeclampsia at all three intervals.



**Figure 4:** sFlt-1/PlGF ratio boxplots (in logarithmic scale) for outcome at delivery from 130 pregnancies without preeclampsia. The boxes represent the interquartile range, the band within the box represents the median value and the whiskers represent values that are 1.5 times the interquartile range. IUGR: Intrauterine growth restriction. Horizontal dotted line represents the cutoff point of 38. Preterm deliveries had significant higher sFlt-1/PlGF ratio than term deliveries in pregnancies with and without IUGR.

and 34 weeks of gestation delivered due to early-onset preeclampsia.

From week 34 to 37 in this cohort, the NPV to predict pregnancy termination due to preeclampsia in the subsequent week decreases to 97.0% (32/33).

On the other hand, due to higher prevalence of preeclampsia requiring delivery within 4 weeks (25.6% vs. 12.9% in the PROGNOSIS study), sFlt-1/PlGF ratio above 38 predicted this clinical outcome with positive predictive value (PPV) of 57.0% (compared to 36.7% in the PROGNOSIS study) (Table 4).

When we compare PLR to predict pregnancy termination due to preeclampsia in 4 weeks, analogous confidence intervals are obtained: the cohort's PLR of 3.8 (95% CI: 2.9–5.1) vs. PROGNOSIS PLR of 3.9 (95% CI: 3.0–5.1).

## Discussion

In the PROGNOSIS study, Zeisler et al. [19] had validated a sFlt-1/PlGF ratio cutoff point of 38 as a useful predictor of the shorter absence of preeclampsia in women with singleton pregnancies and clinical signs that are suggestive of the disorder. In spite of higher prevalence of pregnancy termination due to preeclampsia in this cohort (33.3% vs. 17.8%), PROGNOSIS study conclusions are applicable to our population, predicting not only the preeclampsia occurrence, but also the need for pregnancy termination. Moreover, when early-onset preeclampsia is examined in particular, a single determination of a sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower before 34 weeks of gestation ruled out delivery due to early-onset preeclampsia without need for subsequent determinations.

From week 34 to 37, we recommend repeating determinations weekly if the suspicion persists, as NPV of pregnancy termination due to preeclampsia in 1 week may decrease in this interval. Furthermore, in this cohort there is one pregnant woman who had a sFlt-1/PlGF ratio of 10 at 28+3 weeks of gestation and developed preeclampsia with delivery at 35+5 weeks of gestation, and she would not have been diagnosed without subsequent determinations after 34 weeks of gestation. These findings are consistent with the results of PROGNOSIS *post-hoc* analysis which reported a NPV of preeclampsia at 4 weeks of 95% [28]. Rule-in to predict pregnancy termination due to preeclampsia in 4 weeks obtained analogous performance of the test when it was positive (positive likelihood ratio), despite prevalence difference. In this case, PPV differences are secondary to prevalence variation, and performance of the test remains constant.

**Table 3:** Comparison with the PROGNOSIS study rule-out of preeclampsia in the subsequent week.

sFlt-1/PlGF ratio <38 within 1 week	n	PE 1W, % (n)	Sensitivity, %	Specificity, %	NPV, %	NLR (95% CI)
PROGNOSIS 2016	550	2.7 (15)	80.0	78.3	99.3	0.26 (0.09–0.70)
Our study	195	17.9 (35)	97.1	67.5	99.1	0.04 (0.01–0.29)

1W, prediction of pregnancy termination due to preeclampsia in 1 week. 95% CI, 95% confidence interval.

**Table 4:** Comparison with the PROGNOSIS study rule-in of preeclampsia in 4 weeks.

sFlt-1/PlGF ratio >38 within 4 weeks	n	PE 4W, % (n)	Sensitivity, %	Specificity, %	PPV, %	PLR (95% CI)
PROGNOSIS 2016	550	12.9 (71)	66.2	83.1	36.7	3.9 (3.0–5.1)
Our study	195	25.6 (50)	98.0	74.5	57.0	3.8 (2.9–5.1)

4W, prediction of pregnancy termination due to preeclampsia 4 weeks. 95% CI, 95% confidence interval.

## Implications for clinical practice

Evidence from the PROGNOSIS study is applicable to primary determinations in our population despite higher prevalence of delivery due to preeclampsia in this cohort. Moreover, in pregnant women with suspected preeclampsia, the first determination of a sFlt-1/PlGF ratio of 38 or lower before 34 weeks of pregnancy rules out the need for pregnancy termination due to early onset of preeclampsia. Other described cutoff points are based on retrospective studies [15, 29], which should be prospectively validated before being applied in clinical practice. Therefore, the sFlt-1/PlGF ratio is a valuable tool to rule out the need for pregnancy termination due to preeclampsia in women in whom the disorder is clinically suspected, and it defines pregnancies with the antiangiogenic state at risk for developing preeclampsia. However, due to the low positive predictive value of preeclampsia in 1 week (39.5%) and considering that, currently, there is no consistent approach to predict the need for pregnancy termination, no treatment recommendation can be made to the test positive patients (sFlt-1/PlGF > 38) except close clinical follow-up.

Dysregulation of angiogenic and antiangiogenic factors is related to placental dysfunction, which is the first and necessary step for development of severe and early onset preeclampsia. However, complications and maternal morbidity can appear long after the onset of placental dysfunction. Therefore, the positive predictive value of this approach is improvable in future research. Nonetheless, prediction of delivery with preeclampsia 4 weeks in advance does not guide clinicians in the decision of whether to terminate pregnancy.

The utility of sFlt-1/PlGF ratio dynamics using repeated measurements still has to be assessed in future studies. Potential benefits of dynamic assessment has been observed in retrospective series [30].

As in the PROGNOSIS study, IUGR pregnancies without preeclampsia were included in this cohort (10.3% 20/195 patients). When IUGR without preeclampsia determines delivery before 37 weeks of pregnancy (6.2% 12/195 patients), the sFlt-1/PlGF ratio is also elevated resulting in false positive results for preeclampsia/HELLP syndrome, but rather reflecting placental dysfunction.

## Strengths and limitations

The possibility of accurately ruling out the need for pregnancy termination due to preeclampsia or HELLP syndrome any time within 24 and 33+6 weeks of gestation on

the basis of the sFlt-1/PlGF ratio is likely to improve clinical decisions with regard to hospitalization versus outpatient monitoring, significantly reducing the patient's cost. Besides the increased cost, unnecessary hospitalization may also lead to increased risk of pregnancy termination and, consequently, newborn prematurity. This finding is consistent with results published by Zeisler et al. [31], showing that among women who did not develop preeclampsia, those who underwent iatrogenic preterm delivery had higher median sFlt-1/PlGF ratios at their first visit than those who did not or who delivered at term.

Our proposal is one single determination of the sFlt-1/PlGF ratio within 24 and 33+6 weeks of gestation when there is clinical suspicion. A ratio of 38 or lower would be enough to rule out the need for pregnancy termination due to early-onset of preeclampsia and HELLP syndrome. These pregnancies can return to community care instead of being admitted to the hospital for observation, and they do not need to repeat another sFlt-1/PlGF ratio before 34 weeks of gestation.

Frusca et al. [32] examined the budget impact of the test. With the test information, 24.3% of women were hospitalized before diagnosis of preeclampsia, of which 33.4% developed preeclampsia. Contrarily, without the test information, 60% of women were hospitalized and only 26.4% developed preeclampsia. Similar results were observed by Vatish et al. [33]. In our study, we did not quantify the cost savings with the model proposed. However, 28.6% (48/168) of running samples before 34 weeks of gestation would have been avoided when the first sFlt-1/PlGF ratio was 38 or lower. In the clinical scenario of early-onset preeclampsia, very high negative predictive value is crucial in the evaluation of a patient with suspected preeclampsia, as failure to detect disease could have devastating consequences for the fetus and the mother.

We have also observed that pregnancies with preterm labor show a higher sFlt-1/PlGF ratio when compared to term deliveries, regardless of the presence of preeclampsia and IUGR [17, 34]. A possible explanation is that impaired production of angiogenic/antiangiogenic factors could induce endothelial alterations not high enough to trigger preeclampsia but sufficient to impair further pregnancy progression, thus leading to preterm labor.

We observed higher PPV in our cohort than in original PROGNOSIS study (see Table 4). This difference may be caused by a higher prevalence of pregnancy termination due to preeclampsia in our population (33.3% vs. 17.8%) due to the exclusion of manifest preeclampsia or a confirmed diagnosis of HELLP syndrome in the PROGNOSIS study. These changes in prevalence caused spectrum effect (sensitivity and specificity variation).

However, no spectrum bias (significant variation of likelihood ratio) has been observed.

Another limitation of our study is the reduced number of delivery termination due to early-onset preeclampsia or HELLP syndrome before 34 weeks of gestation (25 patients) and late onset of these disorders (40 patients), caused by the single-centre nature of design. We need to validate these results with a higher number of deliveries with preeclampsia. There is also the need to evaluate the role of subsequent determinations of the sFlt-1/PlGF ratio when preeclampsia suspicion persists.

The elecsys sFlt-1 and PlGF immunoassays were used to determine the sFlt-1/PlGF ratio in this study. The optimal cutoff point for the sFlt-1/PlGF ratio may be different for other immunoassays.

**Acknowledgments:** The authors thank Carles Barceló for methodological support and supervision.

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission. All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following three requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

- Duley L. The global impact of preeclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009;33:130–7.
- Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Montquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001;20:XI–XIV.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75–84.
- McClure JH, Cooper GM, Clutton-Brock TH. Saving mothers' lives: reviewing maternal deaths to make motherhood safer: 2006–8: a review. *Br J Anaesth* 2011;107:127–32.
- Schutte J, Steegers E, Schuitmaker N, Santema J, de Boer K, Pel M, et al. Rise in maternal mortality in the Netherlands. *Br J Obstet Gynaecol* 2010;117:399–406.
- Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1200–4.
- Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* 2011;123:2856–69.
- Romero R, Chaiworapongsa T. Preeclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an antiangiogenic state. *J Clin Invest* 2013;123:2775–7.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355:992–1005.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649–58.
- Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:466–80.
- Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancies disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:58.e1–58.e8.
- Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:161.e1–161.e11.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factor and the risk of preeclampsia. *N Engl J med* 2004;350:672–83.
- Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Lavine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation* 2012;125:911–9.
- Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension* 2014;63:346–52.
- Alvarez-Fernandez I, Prieto B, Rodríguez V, Ruano Y, Escudero A, Alvarez FV. New biomarkers in diagnosis of early onset preeclampsia and imminent delivery prognosis. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1159–68.
- PlGF [package insert]. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany. 2013-08, V 6.0.
- Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, Vathis M, Phil D, Staff AC, et al. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Eng J Med* 2016;374:13–22.
- Perales A, Delgado JL, De la Calle M, García-Hernández JA, Escudero AI, Campillos JM, et al. sFlt-1/PlGF for early onset preeclampsia prediction: STEPS (Study of Early Pre-eclampsia in Spain). *Ultrasound Obstet Gynecol*. In press.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:112–31.
- Straus SE, Richardson WS, Glasziou P, Haynes RB. Diagnosis and screening. In: Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. 3rd ed. Oxford (UK): Elsevier, 2005:89–90.

23. Guyatt G, Sackett DL, Haynes RB. Evaluating diagnostic tests. In: Haynes RB, Sackett DL, Guyatt GH, et al., editors. *Clinical epidemiology: how to do clinical practice research*. New York (NY): Lippincott William and Wilkins, 2006:294–5.
24. Elie C, Coste J. A methodological framework to distinguish spectrum effects from spectrum biases and to assess diagnostic and screening test accuracy for patient populations: Application to the Papanicolaou cervical cancer smear test. *BMC Med Res Methodol* 2008;8:7.
25. Goehring C, Perrier A, Morabia A. Spectrum bias: a quantitative and graphical analysis of the variability of medical diagnostic test performance. *Stat Med* 2004;23:125–35.
26. Dragan I, Georgiou T, Prodan N, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for preeclampsia using sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 at 30–73 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;49:73–7.
27. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, et al. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of preeclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:241–6.
28. Verlohren S, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. The sFlt-1/PlGF ratio can rule out preeclampsia for up to four weeks in women with suspected preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2016;6:140–1.
29. Gómez-Arriaga PI, Herraiz I, López-Jiménez EA, Gómez-Montes E, Denk B, Galindo A. Uterine artery Doppler and sFlt-1/PlGF ratio: usefulness in diagnosis of preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:530–7.
30. Schaarschmidt W, Rana S, Stepan H. The course of angiogenic factors in early- vs. late-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *J Perinat Med* 2013;41:511–6.
31. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase-1-to-placental growth factor ratio and time to delivery in women with suspected preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2016;128:261–9.
32. Frusca T, Gervasi MT, Paolini D, Dionisi M, Ferre F, Cetin I. Budget impact analysis of sFlt-1/PlGF ratio as prediction test in Italian women with suspected preeclampsia. *J Materna-Fetal Neonat Med* 2016;13:1–14.
33. Vatish M, Strunz-Mckendry T, Hund M, Allegranza D, Wolf C, Smare C. sFlt-1/PlGF ratio test for pre-eclampsia: an economic assessment for the UK. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;48:765–71.
34. Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH, Kim MY, Ryu HM. Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors. *Obstet Gynecol* 2008;111:1403–9.

### 3.2. Artículo 2



## Addition of N-terminal pro-B natriuretic peptide to soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio > 38 improves prediction of pre-eclampsia requiring delivery within 1 week: a longitudinal cohort study

E. SABRIÁ<sup>1</sup>, P. LEQUERICA-FERNÁNDEZ<sup>2</sup>, P. LAFUENTE-GANUZA<sup>2</sup>, E. EGUIA-ÁNGELES<sup>2</sup>, A. I. ESCUDERO<sup>3</sup>, E. MARTÍNEZ-MORILLO<sup>3</sup> , C. BARCELÓ<sup>4</sup> and F. V. ÁLVAREZ<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Obstetrics and Gynaecology Department, Hospital-Residència Sant Camil, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Biochemistry Department, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Obstetrics and Gynaecology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>4</sup>Department of Computer Science and Applied Mathematics, Universitat de Girona, Girona, Spain; <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

**KEYWORDS:** generalized estimating equations; longitudinal study; NT-proBNP; pre-eclampsia rule-in; sFlt-1/PlGF ratio

### ABSTRACT

**Objective** Short-term prediction of pre-eclampsia (PE) using the soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio is characterized by frequent false-positive results. As such, no treatment can be recommended to test-positive patients and multiple measurements are often required. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP), uric acid and the sFlt-1/PlGF ratio for prediction of delivery with PE within 1 week in singleton pregnancies with suspected PE and sFlt-1/PlGF ratio > 38.

**Methods** This was a longitudinal prospective cohort study of singleton pregnancies presenting at 24+0 to 36+6 weeks of gestation with clinically suspected PE and sFlt-1/PlGF ratio > 38, enrolled between January 2015 and June 2017. Multiple samples per patient were allowed but were restricted to one sample per gestational week. From 495 enrolled patients, 270 blood samples from 134 patients were ultimately analyzed. By using generalized estimating equations (GEE), the best-fit model was selected for prediction of delivery with PE within 1 week. The predictive value of this model was then assessed using area under the paired-ROC curve (AUC) analysis.

**Results** The best-fit model included the sFlt-1/PlGF ratio, NT-proBNP and the gestational week at the time of the measurement. This combined model was compared with the GEE model based on the sFlt-1/PlGF ratio and the gestational week at the time of the measurement (reduced model). The AUC for the combined model was 0.845

(95% CI, 0.787–0.896), which was significantly greater ( $P = 0.011$ ) than that of the reduced model (0.786 (95% CI, 0.722–0.844)).

**Conclusion** The addition of NT-proBNP assessment improves the short-term prediction of delivery as a result of PE compared with sFlt-1/PlGF ratio alone, when the sFlt-1/PlGF ratio is > 38. This finding should be considered in future research on the assessment of short-term risk of delivery as a result of PE. Copyright © 2018 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.

### INTRODUCTION

Pre-eclampsia (PE) is a pregnancy-related disorder, characterized by the onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation<sup>1</sup>, which constitutes a major cause of maternal and fetal morbidity and mortality<sup>2,3</sup>. Although the pathophysiology of PE is not understood fully, it is well established that the placenta plays a central role in development of the disease. It has been hypothesized that genetic, immunologic and environmental factors lead to poor placentation, which leads to the imbalanced production of pro- and anti-angiogenic biomarkers<sup>4–6</sup>. As a result, women with PE have been shown to have decreased serum concentrations of placental growth factor (PlGF) and increased levels of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)<sup>7–9</sup>. Therefore, sFlt-1/PlGF ratio has been evaluated for diagnosis of the disease and used to estimate the risk of imminent delivery<sup>10–16</sup>.

Women with PE experience cardiovascular alterations, such as increased blood pressure and peripheral vascular

Correspondence to: Dr F. V. Álvarez, Servicio de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011, Oviedo, Spain (e-mail: falvarezmen@gmail.com)

Accepted: 19 February 2018

resistance, vasoconstriction or reduced plasma volume<sup>17</sup>. As these changes represent a stressful scenario, the heart responds by producing cardiac damage markers, which have been proposed as useful tools in the evaluation of PE<sup>16–19</sup>. Moreover, PE is a risk factor for future cardiovascular disease<sup>20,21</sup>. In particular, N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP), which is released from cardiac myocytes in response to myocardial stretch or ischemia and is used as a biomarker of chronic heart failure in non-obstetric populations<sup>22</sup>, is present at higher concentrations in women with PE<sup>23–28</sup>. In pregnancies complicated by PE, there appears to be a graded increase in natriuretic peptide levels with increasing severity of the disease<sup>24</sup>, which may predict cardiovascular complications<sup>29</sup>. Additionally, the levels of NT-proBNP do not change throughout pregnancy in healthy women<sup>30</sup>, and its transplacental transfer seems negligible<sup>31</sup>. The rationale behind including NT-proBNP evaluation is the assessment of maternal consequences of PE, as NT-proBNP may reflect the cardiac changes occurring in the mother during PE.

The aim of this study was to develop a combination of biochemical markers for predicting short-term delivery in pregnancy with PE and a sFlt-1/PlGF ratio > 38, by assessing sFlt-1/PlGF ratio, NT-proBNP and the uric-acid Z-score.

## METHODS

### Study design

As shown by the PROGNOSIS (Prediction of Short-Term Outcome in Pregnant Women with Suspected Pre-eclampsia) study, a sFlt-1/PlGF ratio  $\leq 38$  adequately rules out the onset of PE in the subsequent week, before 37 weeks of gestation<sup>16</sup>. This finding is applicable to populations with varying incidence of PE and when the evaluated outcome is delivery as a result of PE, as assessed in our previous study<sup>32</sup>. We therefore conducted a longitudinal study to assess sFlt-1/PlGF ratio, NT-proBNP and uric acid Z-score only in patients with a sFlt-1/PlGF ratio > 38.

### Subjects and samples

This was a prospective cohort study of pregnant women admitted to the obstetric emergency department or seen at the high-risk pregnancy clinic, with signs or symptoms of PE. A total of 495 women were enrolled at the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) between January 2015 and June 2017. The inclusion criteria were: high blood pressure; proteinuria; worsening of pre-existing hypertension or proteinuria; abnormal uterine-artery Doppler; headache not responding to analgesics; visual symptoms (blurry vision or flashing lights) and/or severe edema affecting hands, feet or face; and a gestational age (GA) at arrival of 24+0 to 36+6 weeks. Abnormal uterine-artery Doppler was defined as pulsatility index above the 95<sup>th</sup> percentile of the Spanish population<sup>33</sup>. Exclusion criteria were multiple

pregnancy, samples obtained outside the range of 24+0 to 36+6 weeks, loss to follow-up and a sFlt-1/PlGF ratio  $\leq 38$ .

We adopted a repeated-measures design instead of using only baseline measurements, as the former allows for risk to be reassessed continually at each gestational week. Consequently, multiple measurements were performed for each patient, depending on whether or not clinical suspicion of PE persisted. We included only the first measurement for each gestational week.

As the severity of PE can vary greatly, its diagnosis was not established as an endpoint. Instead, we assessed severity of PE by considering the need for pregnancy termination as a result of PE. Therefore, the evaluated endpoint was diagnosis of PE leading to delivery within 1 week of the measurement.

Women who had manifest PE or a confirmed diagnosis of HELLP syndrome were not excluded, as this would reduce the external validity of the study. The majority of deliveries of women with PE were induced. The clinical staff making the decision to terminate pregnancy were blinded to the sFlt-1/PlGF ratio and NT-proBNP results. Laboratory staff members were blinded to subjects' clinical information. The study was approved by the Independent Ethics Committee of Asturias. Written informed consent was obtained from each patient.

### Analytical assay

Blood samples were collected in serum separator tubes either at emergency admission or at the outpatient clinic, and centrifuged at 1200 g for 10 min. sFlt-1, PlGF and NT-proBNP concentrations were determined using an electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP) on a Cobas e601 automated immunoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with a turnaround time of 18 min. The measuring ranges were 3–10 000 pg/mL for PlGF, 10–85 000 pg/mL for sFlt-1 and 5–35 000 ng/mL for NT-proBNP, with corresponding limits of quantitation of 10 pg/mL, 15 pg/mL and 5 ng/mL, respectively. The interassay coefficients of variation, as determined with PreciControl Multimarker 1 and 2 for PlGF and sFlt-1, and with PreciControl Cardiac 1 and 2 (Roche Diagnostics) for NT-proBNP, ranged from 1.5% to 4.5% during the study. No specific interferences have been reported for any of the assays used. Elecsys sFlt-1, PlGF and NT-proBNP immunoassays were used in this study. Results may differ for other immunoassays.

Uric acid was measured using a colorimetric assay on the Cobas e501 immunoanalyzer (Roche Diagnostics). As uric acid level increases during non-hypertensive pregnancies, we adjusted it for GA and computed the uric acid Z-score<sup>34</sup> using the equation: (uric acid concentration – mean uric acid concentration for GA)/SD of uric acid concentration for GA.

### Diagnostic criteria

Pre-eclampsia was diagnosed according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)

definition<sup>35</sup>. Hypertension was defined as blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg on two separate occasions ( $\geq 24$  h apart). Proteinuria was defined as either  $\geq 300$  mg of protein per 24-h urine collection or a protein/creatinine ratio of  $\geq 30$  mg/mmol. Note that a score for protein of 2+ or greater on dipstick urinalysis and  $\geq 30$  mg of protein/dL in a spot urine sample was not considered a suitable marker of proteinuria. In the absence of proteinuria, PE was defined as new-onset hypertension with the new onset of any of the following: thrombocytopenia ( $< 100\,000/\mu\text{L}$ ), renal insufficiency (creatinine concentration  $> 1.1$  mg/dL), impaired liver function, pulmonary edema, or cerebral or visual symptoms.

HELLP syndrome was defined as hemolysis (lactate dehydrogenase  $> 600$  IU/L), elevated liver enzyme levels (aspartate aminotransferase  $> 70$  IU/L) and low platelet count ( $< 100\,000/\mu\text{L}$ ) according to the Tennessee Classification System<sup>36</sup>. HELLP syndrome was considered a feature of severe PE. Nine (6.7%) pregnancies had diagnosis of HELLP syndrome.

Fetal growth restriction (FGR) was defined as estimated fetal weight below the 10<sup>th</sup> percentile caused by a pathological process that inhibited the normal growth potential. This pathological process had to be demonstrated after 22 weeks of gestation with oligohydramnios (amniotic fluid index  $< 10^{\text{th}}$  percentile) or Doppler ultrasonography pulsatility index of the umbilical artery  $> 95^{\text{th}}$  percentile.

Final outcomes were reviewed by an independent obstetrician and were assessed at the time of delivery.

### Statistical analysis

The aim of this study was the development of a short-term predictor of delivery in women with PE. As multiple marker measurements were taken for each subject at different timepoints, they are correlated. As such, the traditional regression model is inappropriate as it assumes independence among observations at different timepoints. If the correlation structure is not considered, there is high risk of false estimation of the regression model parameters<sup>37</sup>. Thus, Harrison and Hulin<sup>38</sup> recommended generalized estimating equations (GEEs) as an appropriate assessment tool for the analysis of longitudinal data. A GEE analysis was developed by Liang and Zeger<sup>39,40</sup> and has been proven to provide more reliable regression estimation than traditional models for longitudinal data or repeated measures.

The GEE model, adjusted for patient clustering by gestational week at measurement, was used to determine the final set of covariates for inclusion in the model. The model estimated the risk of delivery with PE in the week following each measurement. GEE methodology was chosen because it is also capable of dealing appropriately with varying numbers of observations, so there is no need for balanced observations<sup>39</sup>. As the aim of this study was not about etiology but rather to assess the potential predictive ability of serum markers for delivery as a result of PE, we did not include patient features (maternal age, weight, comorbidities,

etc) in the model. The Wald chi-square test was used to decide the inclusion of covariates in the GEE model, applying a backwards elimination process with  $P < 0.05$ . The gestational week of the measurement was retained to control for potential confounding effects. An exchangeable correlation structure was selected for GEE because it best described the correlation structure of the data among other correlation structures. This correlation structure indicates that each observation within an individual is correlated equally with every other observation in that individual<sup>41</sup>. The goodness-of-fit of the final model was then assessed using quasi-likelihood under the independence model criterion.

Comparisons between groups were performed using the Mann–Whitney *U*-test for quantitative variables and the chi-square test for proportions. Area under the receiver–operating characteristics (ROC) curve (AUC) estimates were calculated by bootstrapping, using 10 000 replicates.

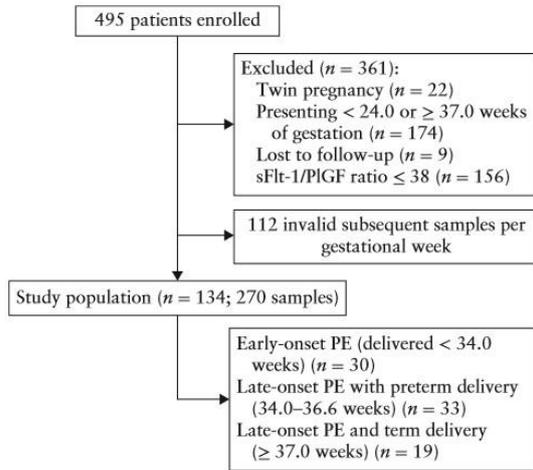
The open-source, freely available R statistical software (R version 3.1.1)<sup>42</sup> was used to conduct all statistical analyses. GEE model construction and paired AUC comparisons were performed using the *geepack*<sup>43</sup> and *PROC*<sup>44</sup> R add-on packages, respectively.

### RESULTS

Of the 495 enrolled women, 361 were excluded for multiple pregnancy ( $n=22$ ), samples obtained outside the range of 24+0 to 36+6 weeks ( $n=174$ ), loss to follow-up ( $n=9$ ) or a sFlt-1/PlGF ratio of 38 or below ( $n=156$ ) (Figure 1). From each woman, only the first measurement for each gestational week was included (thus 112 samples were excluded). Ultimately, a total of 270 samples from 134 patients were analyzed. Of these women, 82 (61.2%) delivered as a result of PE, including 30 cases of early-onset PE (delivery before 34 weeks of gestation), 33 cases of late-onset PE with preterm birth (from 34+0 to 36+6 weeks) and 19 cases of late-onset PE with term birth (from 37+0 weeks onwards). In the latter group, seven women delivered after 38 weeks of gestation; they therefore did not meet the assessed endpoint (delivery with PE within 1 week from the measurement) when including samples taken at up to 37 weeks of gestation. Twenty-six (19.4%) women were diagnosed with PE after inclusion. Women were included at a median GA of 32.2 (interquartile range (IQR), 30.3–34.1) weeks and their pregnancy was prolonged for a median of 6 (IQR, 3–14) days. Tables 1 and 2 show the epidemiological and clinical characteristics of the population and samples, respectively, according to study group.

### Longitudinal assessment of effect of markers and GA on risk of delivery with PE over time

GEE was performed to ascertain the effect of the sFlt-1/PlGF ratio, NT-proBNP and uric-acid Z-score on the likelihood of delivery with PE within 1 week, with consideration for the gestational week in which



**Figure 1** Flowchart summarizing recruitment of women with suspected pre-eclampsia (PE) and their PE diagnosis at delivery. sFlt-1/PlGF, soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor.

the blood sample was taken. Serum uric-acid concentration, uric-acid Z-score, hyperuricemia corrected for GA (uric-acid Z-score ≥ 1) and uric-acid Z-score ≥ 2 were eliminated during the model-construction process. The model ultimately included GA at the time of the measurement, logarithmic transformation of the sFlt-1/PlGF ratio and NT-proBNP. Increasing NT-proBNP level and sFlt-1/PlGF ratio were associated with increased likelihood of delivery with PE. The equation of the model is:

$$y = -16.436 + 0.176 \times GA + 1.125 \times \log(sFlt-1/PlGF \text{ ratio}) + 0.875 \times \log(NT-proBNP).$$

From the  $y$ -value provided by the model, the patient-specific *a-posteriori* risk ( $\pi$ ) for delivery with PE within 1 week is given by the formula:  $\pi = e^y / (1 + e^y)$ . This model is referred to as the combined model.

Another GEE model was constructed, based solely on the log-transformed sFlt-1/PlGF ratio and GA at the time of the measurement. Its estimated equation is:

$$y = -13.055 + 0.157 \times GA + 1.414 \times \log(sFlt-1/PlGF \text{ ratio}).$$

This model is referred to as the reduced model.

According to the corrected quasi-likelihood under the independence model criterion (QICC), the combined model was found to be better than the reduced model as the QICC of the former is 235.3, which is lower than that of the reduced model (266.0).

As both models were estimated from the same population, we also compared the predictive ability of the two models from the respective ROC curves (Figure 2). The estimate of the AUC of the combined model was 0.845 (95% CI, 0.787–0.896), which was significantly greater (DeLong test  $P = 0.011$ ) than the estimate of the AUC of the reduced model, which was 0.786 (95% CI, 0.722–0.844).

**Table 1** Demographic and clinical characteristics of 134 pregnant women with suspected pre-eclampsia (PE) and soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio > 38 at enrolment at 24 + 0 to 36 + 6 weeks' gestation, according to whether they had PE at delivery

Characteristic	PE at delivery (n = 82)	No PE at delivery (n = 52)
Measurements (n)	1 (1–2)	1 (1–3)
Age (years)	35 (31–38)	36 (31.5–38)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.5 (26.8–33.3)	30.3 (27–34.5)
Pre-existing diabetes	0	3.8
Gestational diabetes	13.4	7.7
Nulliparous	73.1	65.3
In-vitro fertilization	6.3	10.2
PE in previous pregnancy	1.3	6.1
CH	11.3	3.9
FGR	20.7	34.6
Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)	201 (152–230)*	215 (182–284.5)
Data at delivery		
GA (weeks)	34.5 (32.0–35.5)*	37.4 (34.4–39.0)
Systolic BP (mmHg)	148 (134–165)*	133 (125–141)
Diastolic BP (mmHg)	89.5 (80–97)*	83 (76–92)
Proteinuria	58.9*	11.1
Reason for suspected PE†		
New-onset hypertension	54.2	58.9
Worsening of CH	1.7	1.8
New-onset proteinuria	27.5*	1.8
FGR	7.5	16.1
Symptoms‡	0.9	3.5
Abnormal uterine perfusion	8.3	17.9

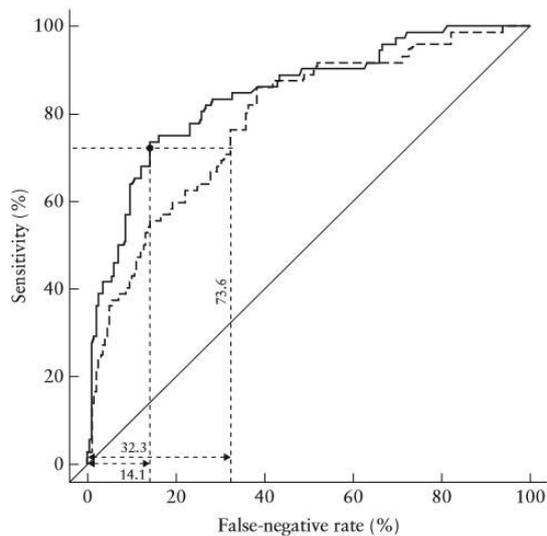
Data are given as median (interquartile range) or %. \* $P < 0.05$  for comparison with women without PE. †There may have been more than one reason for suspected pre-eclampsia. ‡Majority of symptoms were feet edema. BMI, body mass index; BP, blood pressure; CH, chronic hypertension; FGR, fetal growth restriction; GA, gestational age.

**Table 2** Clinical findings from 270 samples from 134 pregnant women with suspected pre-eclampsia (PE) and soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio > 38 at enrolment at 24 + 0 to 36 + 6 weeks' gestation, according to whether they had delivery with PE within 1 week of sampling

Parameter	No delivery with PE within 1 week (n = 198)	Delivery with PE within 1 week (n = 72)
GA (weeks)	32.5 (30–35)	33.3 (30.2–35)
s-Flt-1/PlGF ratio	102 (60–208)	293.5 (129.5–534)†
NT-proBNP (IU/L)	59 (33–106)	159 (81.5–409)*
Uric acid (mg/dL)	4.9 (4.1–5.6)	5.9 (5.05–7.35)*
Uric acid Z-score	1.50 (0.58–2.46)	2.75 (1.77–4.09)*
Uric acid Z-score ≥ 1	64.6	87.5*
Uric acid Z-score ≥ 2	35.4	69.4*

Data are given as median (interquartile range) or %. Only first measurement for each gestational week is included. \* $P < 0.01$  compared with women without delivery with PE within 1 week. GA, gestational age at sampling; NT-proBNP, N-terminal pro-B natriuretic peptide.

As the study design was longitudinal and the risk of presenting delivery with PE increased with GA, a fixed cut-off of sFlt-1/PlGF ratio and NT-proBNP could not be set. However, for the optimal cut-off of the ROC curve



**Figure 2** Receiver–operating characteristics (ROC) curve for prediction of pre-eclampsia (PE) requiring delivery within 1 week in 134 women (270 samples) with suspected PE and soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio > 38, for combined-risk generalized estimating equation (GEE) model of N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP), gestational age at time of measurement and soluble sFlt-1/PlGF ratio (—, area under the curve (AUC)=0.845), and for GEE reduced (without NT-proBNP) model (---, AUC=0.786). Optimal cut-off of ROC curve (which maximizes Youden index) of combined model is indicated (---); there is false-positive reduction of 18.2% at this point. DeLong test,  $P=0.011$ .

(which maximizes the Youden index) of the combined model, the sensitivity and false-positive rate (FPR) were 73.6% and 14.1%, respectively. For the same sensitivity, the FPR of the reduced model increased to 32.3%. This means that, by adding NT-proBNP, a FPR reduction that is 18.2% greater than that using different cut-offs of the sFlt-1/PlGF ratio could be achieved.

#### Complementary analysis

We also performed *post-hoc* retrospective analyses considering only one measurement per patient in order to assess the behavior of predictors in different situations.

#### NT-proBNP as a short-term marker

In pregnancies delivered without development of PE ( $n=52$ ), NT-proBNP did not vary throughout the pregnancy (median = 38; IQR, 25–67). Spearman's correlation coefficient for the relationship between NT-proBNP and GA at first determination was not significantly different from 0 ( $r, -0.135$ ;  $P=0.35$ ) (Figure S1).

Longitudinal assessment of sFlt-1/PlGF ratio and NT-proBNP was performed considering delivery as the reference point. During the last 2 weeks of pregnancy, sFlt-1/PlGF ratio and NT-proBNP were both significantly higher in pregnancies presenting PE at delivery compared

with those not affected. When considering samples obtained before 2 weeks of delivery, this difference was also significant for sFlt-1/PlGF ratio but not for NT-proBNP (Figures 3 and 4). This finding indicates that NT-proBNP increases in pregnancy with PE that is close to delivery.

In order to ensure that maternal features did not alter NT-proBNP level, NT-proBNP distributions were compared between pregnancies with and those without diverse dichotomic factors (gestational diabetes, chronic hypertension, parity, PE in previous pregnancy, *in-vitro* fertilization, FGR, obesity, maternal age > 40 years), considering only pregnancies without PE. We also assessed the correlation between NT-proBNP and the continuous factors body mass index and maternal age on pregnancies that did not deliver as a result of PE. All performed tests gave a non-significant result (Table S1 and Figures S2 and S3). Race, renal disease and previous diabetes were not assessed because there were no Afro-Caribbean subjects or patients with nephropathy, and only two patients with pre-existing diabetes.

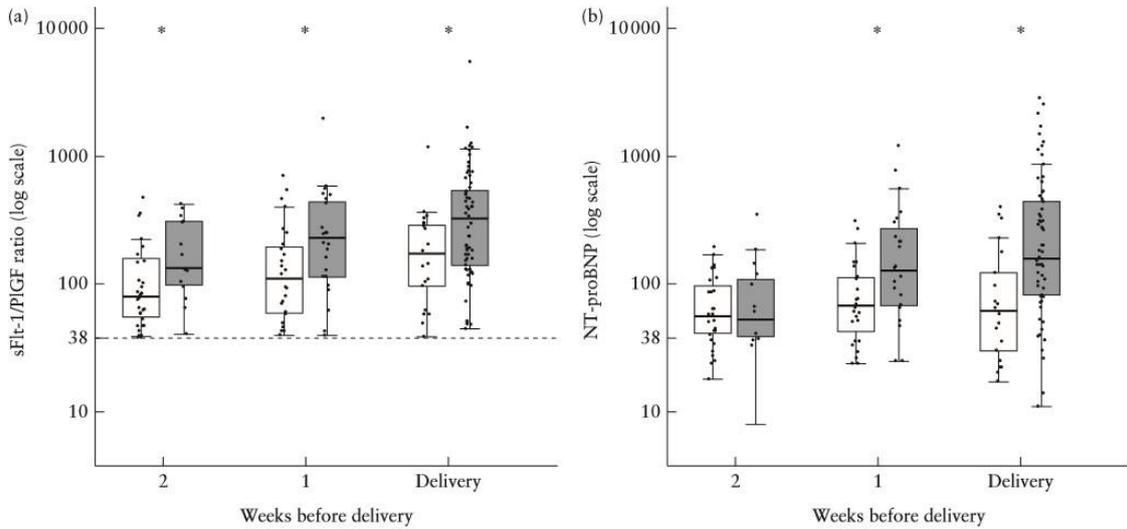
#### Isolated FGR

A total of 34 (25.4%) out of 134 pregnancies did not exhibit isolated FGR or PE at delivery, 18 (13.4%) presented isolated FGR and 82 (61.2%) experienced PE with or without FGR. Considering only the last measurement for each pregnancy, predictors were compared between the three groups. Median sFlt-1/PlGF ratio was 58 (IQR, 44–79) for normal pregnancies, 143 (IQR, 58–321) for the isolated FGR group and 174.5 (IQR, 97–457) for the PE group. Median NT-proBNP was 47.5 (IQR, 25–89) for normal pregnancies, 48 (IQR, 24–59) for the isolated FGR group and 156.5 (IQR, 78–343) for the PE group. There were significant differences in the sFlt-1/PlGF ratio between normal pregnancies and the isolated FGR group, and between normal pregnancies and the PE group, but not between the isolated FGR and PE groups ( $P=0.14$ ). Conversely, there were significant differences in NT-proBNP between normal pregnancies and the PE group, and between the isolated FGR and PE groups, but not between normal pregnancies and the isolated FGR group ( $P=0.56$ ) (Figure 5).

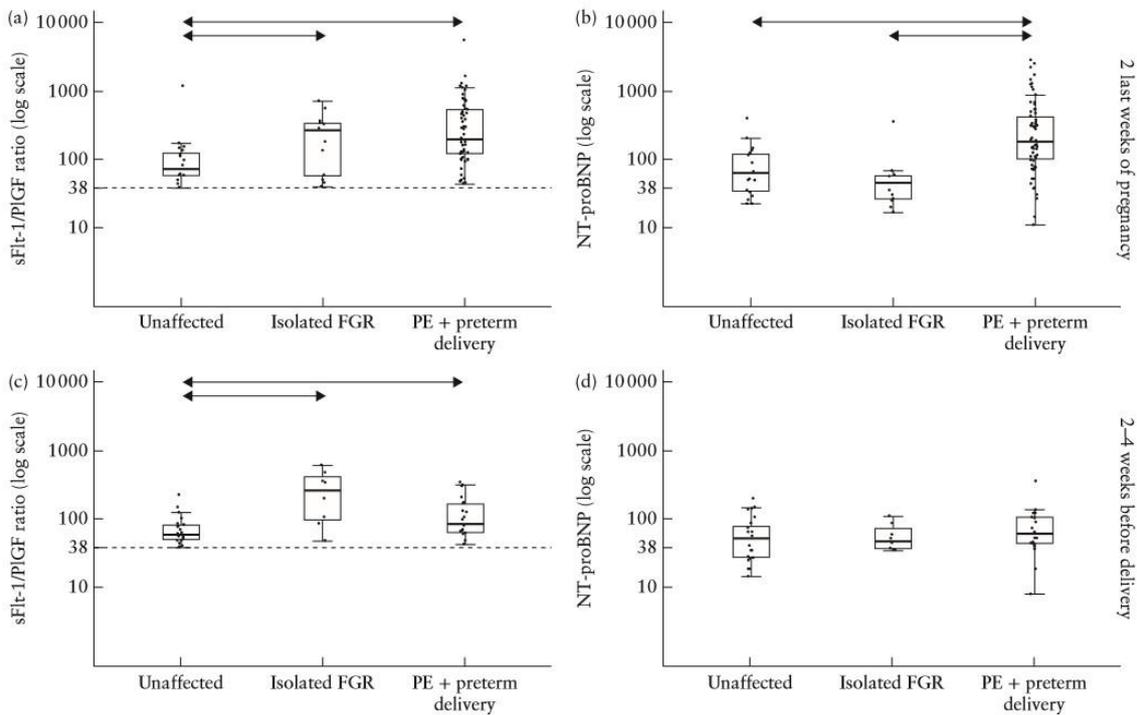
#### Chronic hypertension

A total of 11 (8.2%) pregnancies were affected by chronic hypertension, of whom seven delivered as a result of PE before 38 weeks of gestation.

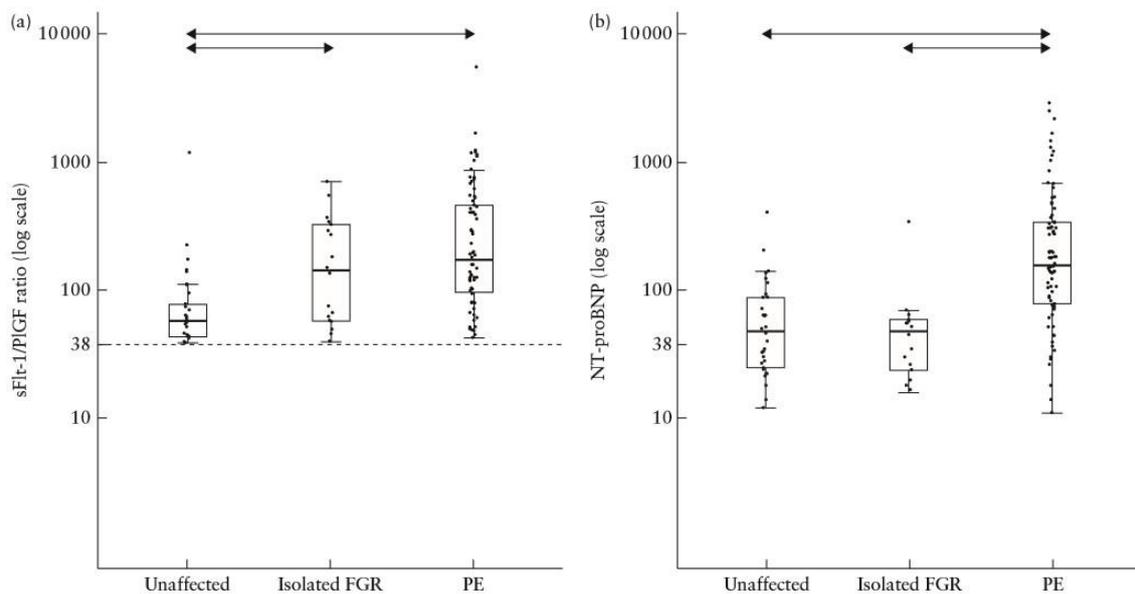
Considering only the last included measurement, we did not detect any significant variation in NT-proBNP at first determination between pregnancies without hypertension ( $n=40$ ; median = 35; IQR, 24.5–62.5), pregnancy-induced hypertension ( $n=10$ ; median = 60.5; IQR, 36–92), and chronic hypertension without PE ( $n=2$ ; median = 30.5; IQR, 28–33). However, these results may be biased because of the small number of samples available in these subgroups.



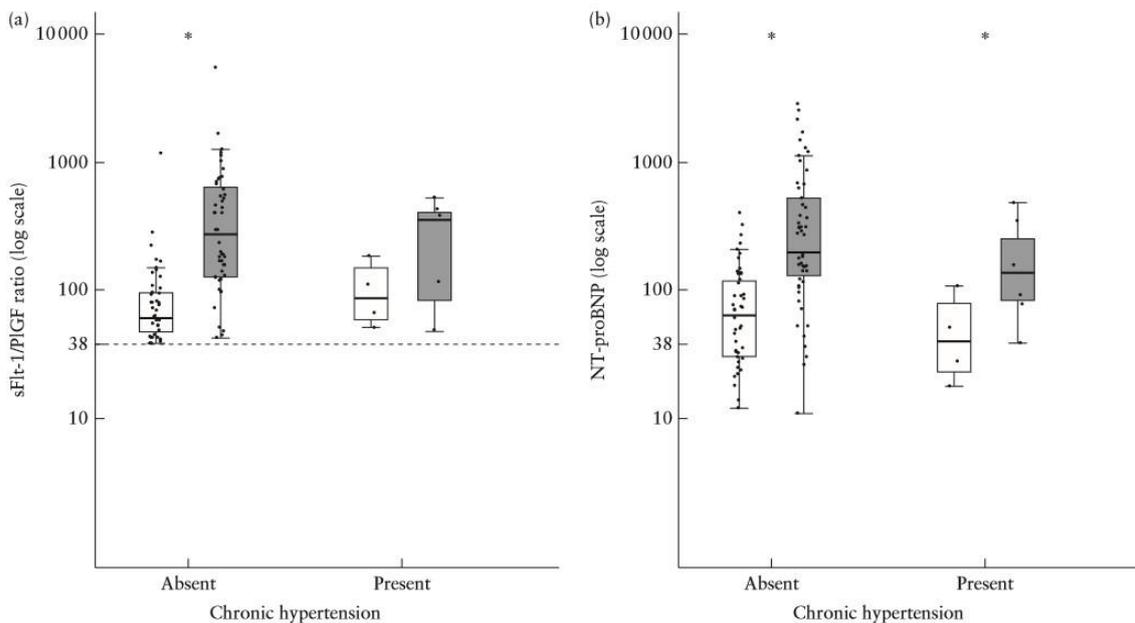
**Figure 3** Box-and-whisker plots of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio (a) and N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP) concentration (b) (both on logarithmic scale) in pregnancies with pre-eclampsia (PE) that delivered prematurely (■) and those which did not (□), grouped according to number of weeks before delivery that measurement was taken. Only one measurement per week for each patient was considered. Isolated fetal growth restricted pregnancies were excluded. Boxes represent median and interquartile range (IQR) and whiskers represent  $1.5 \times$  IQR. sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 is shown (----). Asterisks indicate significant differences between groups (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ).



**Figure 4** Box-and-whisker plots of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio (a,c) and N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP) concentration (b,d) (both on logarithmic scale) in pregnancies without pre-eclampsia (PE) or fetal growth restriction (FGR) at delivery (Unaffected), with isolated FGR or with PE and premature delivery, when considering only last measurement in final 2 weeks of pregnancy for each patient (104 pregnancies) (a,b), and only final measurement 2–4 weeks before delivery for each patient (53 pregnancies) (c,d). Boxes represent median and interquartile range (IQR) and whiskers represent  $1.5 \times$  IQR. sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 is shown (----). Arrows indicate significant differences between groups (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ).



**Figure 5** Box-and-whisker plots of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor (PlGF) ratio (a) and N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP) concentration (b) (both on logarithmic scale) in pregnancies without pre-eclampsia (PE) or fetal growth restriction (FGR) at delivery (Unaffected), with isolated FGR or with PE. Only last measurement of each patient was considered. Boxes represent median and interquartile range (IQR) and whiskers represent  $1.5 \times$  IQR. sFlt-1/PlGF ratio cut-off point of 38 is shown (---). Arrows indicate significant differences between groups (Mann-Whitney  $U$ -test,  $P < 0.05$ ).



**Figure 6** Box-and-whisker plots of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/placental growth factor ratio (PlGF) (a) and N-terminal pro-B natriuretic peptide (NT-proBNP) concentration (b) (both on logarithmic scale) in pregnancies with (■) and those without (□) pre-eclampsia and premature delivery, grouped according to presence of chronic hypertension. Only last measurement of each patient was considered. Isolated fetal growth restriction (FGR) pregnancies were excluded. Chronic hypertension was present in 8.2% (11/134) of women. Boxes represent median and interquartile range (IQR) and whiskers represent  $1.5 \times$  IQR. sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 is shown (---). Asterisks indicate significant differences between groups (Mann-Whitney  $U$ -test,  $P < 0.05$ ).

When chronic hypertension was present, there was more overlapping of PlGF/sFlt-1 ratio concentrations between pregnancies that developed PE and those that did not. Consequently, while the difference in patients without chronic hypertension was significant ( $P < 0.001$ ), when chronic hypertension was present, it was not significant ( $P = 0.22$ ). On assessment of NT-proBNP, the overlap was found to be decreased in the presence of chronic hypertension, and differences maintained statistical significance ( $P < 0.001$  for women without chronic hypertension and  $P = 0.025$  for those with chronic hypertension) (Figure 6).

## DISCUSSION

Although a sFlt-1/PlGF ratio of  $\leq 38$  has been demonstrated to have a high negative predictive value for ruling out PE<sup>16</sup>, a limitation of this strategy for screening is the high rate of false-positive results. In this cohort, 38.8% (52/134) of pregnancies with a sFlt-1/PlGF ratio  $> 38$  did not exhibit PE at delivery and only 26.9% (36/134) developed this outcome during the following week. Therefore, many attempts have been made to establish sFlt-1/PlGF ratio cut-offs  $> 38$ , in order to increase the positive predictive value for PE<sup>12,15,45-47</sup>. On analyzing our data, we identified three sources of false-positive results of sFlt-1/PlGF ratio when predicting PE.

The first source is the time lapse between marker alteration and the indication for pregnancy termination as a result of PE. sFlt-1/PlGF ratio is a long-term marker of poor placentation. Conversely, NT-proBNP is a short-term risk marker and its level increases close to delivery because of PE.

A second source is isolated FGR. A total of 51.4% (18/35) of pregnancies with FGR did not develop PE. The sFlt-1/PlGF ratio rises in severe and early-onset cases of placental dysfunction (FGR with or without PE)<sup>48</sup>. On the contrary, NT-proBNP is not altered in the event of isolated FGR. Consequently, NT-proBNP can help to classify isolated FGR-affected pregnancies, which, in our opinion, is of paramount importance. While there is no curative treatment other than pregnancy termination, neonatal and maternal prognosis depends on when this decision is taken. Pregnancy termination should be decided on the basis of risk assessment, and surveillance of the mother and fetus should define these risks. The surveillance of pregnancy affected by PE should focus on the mother (mainly through laboratory markers), in order to prevent maternal complications. In contrast, in pregnancy affected by isolated FGR, supervision should be focused on the fetus and its wellbeing (mainly through ultrasound markers). Therefore, we did not define PE using the ISSHP 2014 revised statement, which includes new-onset gestational hypertension with FGR without any other maternal features (proteinuria)<sup>49</sup>.

The final source of false-positive results identified was chronic hypertension. Endothelial dysfunction, which is the main finding in women with PE<sup>18,19</sup>, hampers physiological adaptation to hemodynamic changes that

occur during pregnancy. In women with chronic hypertension, a lower degree of impaired placentation may be sufficient for PE to develop, as a result of pre-existing endothelial dysfunction in these patients<sup>50</sup>. Accordingly, sFlt-1/PlGF ratio shows a more modest role in predicting superimposed PE<sup>51,52</sup>. NT-proBNP seems to perform better in this situation, as it is not related to impaired placentation.

Therefore, we compared the strategy of sFlt-1/PlGF ratio using different cut-offs with a strategy combined with NT-proBNP assessment. This study shows that the addition of NT-proBNP assessment yields superior results for the prediction of delivery with PE in the subsequent week compared with the use of sFlt-1/PlGF ratio alone, when the sFlt-1/PlGF ratio is  $> 38$ . This therefore suggests that PE is a multisystemic disease from a diagnostic point of view. Furthermore, markers of the maternal manifestation of this placental dysfunction, such as NT-proBNP, might help to differentiate PE from poor placentation affecting only the fetus.

To our knowledge, this is the first study that longitudinally assesses the performance of the combination of these PE markers (sFlt-1/PlGF-ratio and NT-proBNP) in the prediction of the need for pregnancy termination as a result of PE. This is important as, currently, only the first measurement for each patient of the sFlt-1/PlGF ratio is validated for use in PE diagnosis (PROGNOSIS study). Subsequent measurements in the same patient are of unknown value because they cannot be considered as being independent. We decided to use a GEE model as we were interested in population average effects of proposed markers, and this approach requires fewer assumptions than a generalized linear mixed model, which includes subject-specific random effects.

Recently, Verlohren *et al.* assessed the role of NT-proBNP for predicting PE, and their results were not conclusive<sup>53</sup>. As NT-proBNP is a short-term marker, only longitudinal studies (i.e. those that allow more than one measurement per patient) are capable of defining its role. However, consistent with our findings, high levels of NT-proBNP were related to shorter pregnancy duration in those with PE.

Factors that modify serum NT-proBNP in the non-pregnant population are: heart failure and other heart conditions; previous insulin-dependent diabetes<sup>54</sup>; increasing age<sup>55</sup>; race<sup>56</sup>; and obesity<sup>57</sup>. To date, adjustment in the level of NT-proBNP for these conditions in the pregnant population has not been reported. We did not observe any need for factor adjustment in our cohort.

In our previous study, we observed no early-onset PE when the baseline sFlt-1/PlGF ratio was  $\leq 38$  in 105 samples taken at between 24+0 and 33+6 weeks' gestation<sup>32</sup>. This finding is consistent with the PROGNOSIS study *post-hoc* analysis, which reported a 95% negative predictive value of PE at 4 weeks<sup>58</sup>. Therefore, the value of subsequent measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for predicting early-onset PE should be investigated further.

As an initial approximation of the role of these markers in PE, we assessed PE as a unique entity. If a sufficient number of patients are enrolled, we would hope to assess the role of each marker for predicting early- and late-onset PE independently. We encourage researchers to characterize more clearly the maternal manifestations associated with placental dysfunction in order to reduce the FPR of PE prediction.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly appreciate Dr Barry Hoffman's comments on the manuscript. This study was partially funded by the Ministerio de Economía y Competitividad [Ministry of Economy and Competitiveness] through the project CODA-RETOS (Ref: MTM2015-65016-C2-1-R (MINECO/FEDER,UE); 2016-2018).

## REFERENCES

- Smáráson AK, Allman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 538–543.
- Friedman AM, Cleary KL. Prediction and prevention of ischemic placental disease. *Semin Perinatol* 2014; 38: 177–182.
- Schutte J, Steegers E, Schuitmaker N, Santema J, de Boer K, Pel M, Vermeulen G, Visser W, van Roosmalen J. Rise in maternal mortality in the Netherlands. *BJOG* 2010; 117: 399–406.
- Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59: 61–78.
- Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010; 5: 173–192.
- Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 466–480.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Suhbatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672–683.
- Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Arai F, Watanabe T, Kario K, Suzuki M. Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia. *Hypertens Res* 2007; 30: 151.
- Lee ES, Oh MJ, Jung JW, Lim JE, Seol HJ, Lee KJ, Kim HJ. The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 94–98.
- Sunderji E, Graziano D, Wothe LC, Rogers B, Sibai SA, Karumanchi C. Automated assays for sVEGF and PlGF as an aid in the diagnosis of preterm preeclampsia: a prospective clinical study. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 40.e1–7.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Savasan ZA, Kusanovic G, Ogge E, Soto Z, Dong Z, Kim CJ, Hassan SS. Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; 24: 1187–1207.
- Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, Lim KH, Wenger JB, Thadhani R, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation* 2012; 125: 911–919.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Cortez JM, Pappas A, Tarca ALK, Chaemsaitong P, Dong Z, Yeo L, Hassan SS. Plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors have a prognostic value in women presenting with suspected preeclampsia to the obstetrical triage area: a prospective study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27: 132–144.
- Alvarez-Fernandez I, Prieto B, Rodriguez V, Ruano Y, Escudero AI, Alvarez FV. New biomarkers in diagnosis of early onset preeclampsia and imminent delivery prognosis. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 1159–1168.
- Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, Sabria J, Markfeld-Erol F, Galindo A, Schoofs K, Denk B, Stepan H. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension* 2014; 63: 346–352.
- Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, Vatis M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Alleganza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S. Predictive value of the sFlt-1/PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med* 2016; 374: 13–22.
- VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 38–48.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649–658.
- Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 123: 2856–2869.
- Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 335: 974.
- Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lic RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ* 2001; 323: 1213–1217.
- Wiczorek SJ, Wu AH, Christenson R, Krishnaswamy P, Gottlieb S, Rosano T, Hager D, Gordanetto N, Chin A, Bailly KR, Maisel A. A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multicenter evaluation. *Am Heart J* 2002; 144: 834–839.
- Fleming SM, O'Byrne L, Grimes H, Daly KM, Morrison JJ. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide in normal and hypertensive pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20: 169–175.
- Kale A, Kale E, Yalinkaya A, Akdeniz N, Corruc N. The comparison of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in preeclampsia and normotensive pregnancy. *J Perinat Med* 2005; 33: 121–124.
- Tihonrn KM, Kööbi T, Vuolteenaho O, Huhtala HS, Uotila JT. Natriuretic peptides and hemodynamics in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 328e1–7.
- Moghbeli N, Srinivas SK, Bastek J, Lu Y, Putt ME, Capola TP, Elovitz MA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a biomarker for hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Perinatol* 2010; 27: 313–319.
- Seong WJ, Kim SC, Hong DG, Koo TB, Park IS. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in hypertensive disorders complicating pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2011; 30: 287–294.
- Alvarez-Fernandez I, Prieto B, Rodriguez V, Ruano Y, Escudero AI, Alvarez FV. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and angiogenic biomarkers in the prognosis of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2016; 463: 150–157.
- Afshani N, Moustaqim-Barrette A, Biccard BM, Rodseth RN, Dyer RA. Utility of B-type natriuretic peptides in preeclampsia: a systematic review. *Int J Obstet Anesth* 2013; 22: 96–103.
- Resnik JL, Hong C, Resnik R, Kazanegra R, Beece J, Bhalla V, Maisel A. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 450–454.
- Johns MC, Stephenson C. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing in neonatal and pediatric patients. *Am J Cardiol* 2008; 101: 76–81.
- Sabriá E, Lequerica-Fernández P, Lafuente P, Ángeles EE, Escudero AI, Martínez-Morillo E, Alvarez FV. Use of the sFlt-1/PlGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 303–311.
- Gómez O, Figueras F, Fernández S, Bannasar M, Martínez JM, Puerto B, Gratacos E. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11–41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 32: 128–132.
- Lind T, Godfrey KA, Otun H, Philips PR. Changes in serum uric acid concentrations during normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; 91: 128–132.
- American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy: Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013; 122: 1122–1131.
- Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 981–991.
- Hanley JA, Negassa A, Edwards MD, Forrester JE. Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 364–375.
- Harrison DA, Hulin CL. Investigations of absenteeism: Using event history models to study the absence-taking process. *J Appl Psychol* 1989; 74: 300.
- Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986; 73: 13–22.
- Zeger SL, Liang K-Y. Longitudinal data analysis using discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 1986; 42: 121–130.
- Burton P, Gurrin L, Sly P. Tutorial in biostatistics. Extending the simple linear regression model to account for correlated responses: An introduction to generalized estimating equations and multi-level mixed modelling. *Stat Med* 1998; 17: 1261–1291.
- R Development Core Team. R: A language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing 2009, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org> [Accessed 3 February 2015].
- Højsgaard S, Halekoh U, Yan J. The R Package geepack for Generalized Estimating Equations. *J Stat Softw* 2006; 15: 1–11.
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinform* 2011; 7: 77.
- Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, Vatis M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Alleganza D, Dinke C, Schoedl M, Dilba P, Hund M, Verlohren S. Soluble fms-like tyrosine kinase-1-to-placental growth factor ratio and time to delivery in women with suspected preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2016; 128: 261–269.
- Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, Calda P, Holzgreve W, Galindo A, Engels T, Denk B, Stepan H. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 58.e1–8.
- Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, Klein E, Lapaire O, Llorba E, Ramoni A, Vatis M, Wertaschnigg D, Galindo A. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia

- in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 241–246.
48. Schoofs K, Grittner U, Engels T, Pape J, Denk B, Henrich W, Verlohren S. The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med* 2013; 42: 61–68.
  49. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens* 2014; 4: 97–104.
  50. Panaitescu AM, Akolekar R, Kametas N, Syngelaki A, Nicolaides KH. Impaired placentation in women with chronic hypertension who develop pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50: 496–500.
  51. Costa RA, Hoshida MS, Alves EA, Zugaib M, Francisco RP. Preeclampsia and superimposed preeclampsia: The same disease? The role of angiogenic biomarkers. *Hypertens Pregnancy* 2016; 35: 139–149.
  52. Ambia AM, Morgan JL, Wilson KL, Roberts SW, Wells CE, McIntire DD, Sanghavi M, Nelson DB, Cunningham FG. Frequency and consequences of ventricular hypertrophy in pregnant women with treated chronic hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217: 467.e1–6.
  53. Verlohren S, Perschel FH, Thilaganathan B, Dröge LA, Henrich W, Busjahn A, Khalil A. Angiogenic markers and cardiovascular indices in the prediction of hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertension* 2017; 69: 1192–1197.
  54. Andreas M, Zeisler H, Handisurya A, Franz MB, Gottsauner-Wolf M, Wolzt M, Kautzky-Willer A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide is decreased in insulin dependent gestational diabetes mellitus: a prospective cohort trial. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10: 28.
  55. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Trawinski J, Pedersen F. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. *Heart* 2003; 89: 745–751.
  56. Gupta DK, de Lemos JA, Ayers CR, Berry JD, Wang TJ. Racial differences in natriuretic peptide levels: the Dallas Heart Study JACC Heart Fail 2015; 3: 513–519.
  57. Madamanchia C, Alhosainib H, Sumida A, Runge MS. Obesity and natriuretic Peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure. *Int J Cardiol* 2014; 176: 611–617.
  58. Verlohren S, Lurba E, Chantraine F, Vatis M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecker SP, Stepan H, Allegranza D, Schoedl M, Dilba P, Hund M, Zeisler H. The sFlt-1/PlGF ratio can rule out preeclampsia for up to four weeks in women with suspected preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2016; 3: 140–141.

#### SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article:

 **Figure S1** Scatterplot with regression line (----) for relationship of N-terminal pro-B natriuretic peptide and gestational age at inclusion, considering pregnancies that did not develop pre-eclampsia ( $n = 52$ ). Spearman's Rho of  $-0.135$  ( $P = 0.35$ ).

**Figure S2** Scatterplot with regression line for relationship of N-terminal pro-B natriuretic peptide and maternal age at inclusion, considering pregnancies that did not develop pre-eclampsia ( $n = 52$ ). Spearman's Rho of  $-0.163$  ( $P = 0.253$ ).

**Figure S3** Scatterplots with regression lines for relationship of N-terminal pro-B natriuretic peptide and body mass index, considering first determination of pregnancies that did not develop pre-eclampsia ( $n = 52$ ). Spearman's Rho of  $-0.144$  ( $P = 0.388$ ).

**Table S1** Evaluation of influence of dichotomic factors on N-terminal pro-B natriuretic peptide concentration in pregnancies without pre-eclampsia ( $n = 52$ ). Only first measurement of each patient is considered

### 3.3. Artículo 3

Manuscrito en proceso de publicación .

#### **FULL TITLE**

**Development of a new prognostic prediction tool for early-onset preeclampsia.**

- **Enric SABRIÀ MD; Barcelona, Spain; Obstetrics and Gynecology Department, Consorci Sanitari de l'Alt Penedès-Garraf, Hospital-Residència Sant Camil,**
- **Paula LAFUENTE-GANUZA FHM; Oviedo, Spain; Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias**
- **Paloma LEQUERICA-FERNANDEZ PhD; Oviedo, Spain; Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias**
- **Ana I. ESCUDERO MD, PhD; Oviedo, Spain; Obstetrics and Gynecology Department, Hospital Universitario Central de Asturias**
- **Eduardo MARTINEZ-MORILLO PhD; Oviedo, Spain; Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias**
- **Carles BARCELÓ-VIDAL PhD; Girona, Spain; Department of Computer Science and Applied Mathematics, Universitat de Girona**
- **Francisco V. ALVAREZ PhD; Oviedo, Spain; Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad de Oviedo**

**Correspondence to Mr Enric SABRIÀ;** Obstetrics and Gynecology Department, Consorci Sanitari de l'Alt Penedès-Garraf, Hospital-Residència Sant Camil; Ronda Sant Camil s/n, 08810 Sant Pere de Ribes; Barcelona, Spain; (e-mail: [enricsabria@hotmail.com](mailto:enricsabria@hotmail.com), cell-phone: 0034 620148850)

**Source of study:** Obstetrics and Gynecology Department and Clinical Biochemistry, Laboratory Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

**Funding:** This study has been partially funded by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades [Ministry of Science, Innovation and Universities] through the CODAMET Project (Ref: RTI2018-095518-B-C21, 2019-2021).

**Short title:** Early-onset preeclampsia prognostic prediction

#### **Disclosure of interests**

The authors have declared that no potential conflicts of interest exist.

#### **Journal policies**

Journal policies detailed in the author's guide have been reviewed. STARD guideline has been used in the composition of this manuscript.

#### **Contribution to authorship**

All authors approved the final version of the manuscript. ES was the first and main author of the manuscript, contributed to the planning of the study and acquisition, analysis, interpretation of data, software development and the writing of the article. PLG and PLF contributed to acquisition of data and revised the article critically. AE contributed to the acquisition, interpretation of data and revised the article critically. EMM contributed to acquisition of data and revised the article critically. CBV designed the study and contributed to planning, analysis and revised the article critically. FA contributed to the planning of the study, analysis and interpretation of data and the writing of the article.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Short-term prediction of preeclampsia using sFlt-1/PIGF ratio has high false positive rate. Therefore, we developed a prognostic prediction tool that predicts early-onset preeclampsia (EO-PE) leading to delivery within one week on pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio above 38 and compared it with an analogous model based on sFlt-1/PIGF ratio and with the 655 sFlt-1/PIGF ratio cutoff.

**Methods:** cohort study of 363 singleton pregnancies with clinical suspicion of preeclampsia before 34 weeks of gestation, allowing repeated assessments (522). 213 samples with an sFlt-1/PIGF ratio above 38 were assessed to construct and identify the best-fit linear mixed model. NT-proBNP, sFlt-1 MoM, PIGF MoM and sFlt-1/PIGF ratio combined with gestational age (GA) were assessed.

**Results:** None of the pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio of 38 or below developed early-onset preeclampsia (309 samples from 240 pregnancies). Conversely, 47 women of 213 assessments (22.1%) with an sFlt-1/PIGF ratio above 38 developed the assessed outcome. The selected model included sFlt-1 MoM, NT-proBNP and GA. Differences in AUC were observed between the selected model and the GA + sFlt-1/PIGF model ( $P=0.04$ ). At an sFlt-1/PIGF ratio cutoff of 655, detection rate was 31.9% (15/47), while the selected model detection was 55.3% (26/47) ( $P=0.008$ ).

**Discussion:** Considering repeated assessments, the sFlt-1/PIGF ratio of 38 or below adequately ruled out EO-PE leading to delivery within one week. However, when sFlt-1/PIGF ratio is above 38, the prediction tool derived from linear mixed model based on gestational age, NT-proBNP and sFlt-1 MoM provided a better prognosis prediction than the sFlt-1/PIGF ratio.

## **KEYWORDS**

Angiogenic factors; early-onset preeclampsia; linear mixed models; NT-proBNP; sFlt-1/PlGF ratio.

## **ABBREVIATIONS**

EO-PE: early-onset preeclampsia; PE: Preeclampsia; sFlt-1: FMS-like tyrosine kinase-1; PlGF: placental growth factor; NT-proBNP: N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; BP: blood pressure;

## **INTRODUCTION**

Preeclampsia (PE) is a leading cause of maternal and perinatal complications<sup>1</sup>. Early-onset PE is a rare and severe subtype of PE (0.2-0.5% of pregnancies) that presents before 34 weeks of gestation<sup>2</sup>.

The main biochemical achievement in predicting PE is the definition of a cutoff point for the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) to placental growth factor (PlGF) ratio of 38 or below to rule-out PE in one week with a negative predictive value of 99.3%, in the PROGNOSIS study<sup>3</sup>. On the other hand, the sFlt-1/PlGF ratio rises in pregnancies with intrauterine growth restriction without PE<sup>4</sup> and has an elevated false positive rate, such as 21.7% in the PROGNOSIS study and 32.5% in our previous study<sup>5</sup>. Therefore, no treatment can be indicated to test positive pregnancies. However, levels of sFlt-1/PlGF ratio correlate with the development of preeclampsia complications and shorter pregnancy duration<sup>6</sup>.

Apart from placental dysfunction, women with PE experience cardiovascular abnormalities such as increased blood pressure and peripheral vascular resistance,

vasoconstriction, or reduced plasma volume<sup>7</sup>. The heart responds by producing N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), which shows higher concentrations in women presenting with severe PE and may predict cardiovascular complications<sup>8-10</sup>. Additionally, NT-proBNP levels do not change during pregnancy in healthy women<sup>11</sup>, and their transplacental transfer seems negligible<sup>12</sup>.

There is a considerable rate of repeated consultations when PE is clinically suspected. In our previous study<sup>13</sup>, 42.6% of women with an sFlt-1/PlGF ratio alone above 38 had repeated measurements, although only one determination per gestational week was permitted.

The purpose of prolonging pregnancy duration in patients with clinical suspicion of early-onset PE is the reduction of newborn morbidity due to decreasing the number of preterm deliveries and their severity. This potential benefit is counterbalanced by potential life-threatening maternal complications. Despite published randomized clinical trials<sup>14-16</sup>, the potential benefits of prolonging pregnancy duration are still unclear. Recent guidelines advocate against the clinical use of angiogenic markers<sup>17</sup>. An improvement in the selection of pregnancies at risk of PE complications is proposed in the present study.

The aim of the study is two-fold: to develop an online prognostic prediction tool to predict delivery as result of early-onset PE within seven days of determination, in pregnancies with an sFlt-1/PlGF ratio alone above 38 and to compare it with an analogous model based on sFlt-1/PlGF ratio and with the sFlt-1/PlGF ratio alone 655 cutoff. When constructing the prognostic prediction tool, we also assessed the addition

of NT-proBNP and the adequacy of using sFlt-1/PIGF ratio raw value or whether these two markers should be gestational age adjusted and considered individually.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

This prospective cohort study was conducted at Hospital Universitario Central de Asturias between January 2015 and November 2018 enrolling consecutive singleton pregnancies with clinical suspicion of PE. The inclusion criteria were high blood pressure, proteinuria, worsening of pre-existing hypertension or proteinuria, abnormal uterine artery Doppler scan, headache not responding to analgesics, visual symptoms and/or severe edema in pregnancies delivered in the institution. An abnormal uterine artery Doppler scan was defined as a pulsatility index above the 95<sup>th</sup> percentile for the Spanish population<sup>18</sup>. Pregnant women who attended before 27 weeks of gestation or after 34 weeks of gestation were excluded. Twin pregnancies or with incomplete data were also excluded. Women who had manifested PE were not excluded, as this would reduce the external validity of the study.

The local ethics committee (CEIC-PA RISKPE1W 175/2018) approved the study protocol and each woman gave written informed consent to take part in the study.

We adopted a repeated measures design instead of using baseline measurements only as the former allows risk to be continually reassessed at each gestational week if clinical suspicion of PE persisted.

As the severity of PE can vary greatly, the evaluated endpoint was diagnosis of early-onset PE leading to delivery within one week from the measurement. The clinical staff

members making the decision to expedite delivery (gynecologists) were blinded to the marker results. The laboratory staff members were blinded to subjects' clinical information.

### **Funding**

The funding organization played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

### **Analytical assay**

Blood samples were centrifuged at 1,200 g for 10 min. The sFlt-1, PlGF and NT-proBNP concentrations were determined using an electrochemiluminescence immunoassay (Elecsys PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP) on the Cobas e601 automated immunoanalyser (Roche Diagnostics, Germany) with a turnaround time of 18 min. The measuring ranges were 3-10,000 pg/ml for PlGF, 10-85,000 pg/ml for sFlt-1 and 5-35,000 ng/ml for NT-proBNP, with corresponding Limits of Quantification of 10 pg/ml, 15 pg/ml and 5 ng/ml, respectively. The inter-assay coefficients of variation, determined with PreciControl Multimarker 1 and 2 for PlGF and sFlt-1 and with PreciControl Cardiac 1 and 2 (Roche Diagnostics, Germany) for NT-proBNP, ranged from 1.5% to 4.5% throughout the study. No specific interferences have been reported for any of the assays used. Equations describing sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio medians per gestational week are described in supplementary materials (see Table S2). Log transformation was used with the marker values to overcome skewed data.

### **Diagnostic criteria**

PE was defined by the presence of de novo hypertension (systolic blood pressure (BP) > 140 mmHg and/or diastolic BP > 90 mmHg measured on two separate occasions at least  $\geq 4$  hours apart) after 20 weeks of gestation accompanied by proteinuria ( $\geq 300$  mg/24h or a protein/creatinine ratio  $\geq 30$  mg/mmol). In the absence of proteinuria, preeclampsia was defined as new onset of hypertension with the new onset of any of the following: thrombocytopenia ( $< 100,000/\mu\text{l}$ ), kidney failure (creatinine concentration  $> 1.1$  mg/dl), impaired liver function, pulmonary edema or cerebral or visual symptoms<sup>19</sup>. To be considered early-onset PE, the onset and thus the assessment had to occur before 34 weeks pregnancy<sup>2</sup>. Final outcomes were reviewed by an independent obstetrician and assessed at time of delivery.

Intrauterine growth restriction was defined as an estimated fetal weight below the 10th percentile as result of a pathological process that inhibits normal growth potential. This pathological process must be demonstrated after 22 weeks of gestation by oligohydramnios (amniotic fluid index below the 10th percentile) or a Doppler ultrasound of the umbilical artery with a pulsatility index above the 95th percentile<sup>20</sup>.

## **Predictive model**

### **Linear mixed models' construction**

Because multiple marker measurements were taken within each subject at different time points, the usual regression model is inappropriate as it assumes independence among observations<sup>21</sup>. Therefore, we analyzed the data using linear mixed models, which offer personal risk estimation, introducing a random component to the prediction.

In the model construction, we did not assess the a priori gestational risk for developing PE, but rather we focused on the biochemical gestational varying parameters, therefore we did not include patient data (maternal age, weight, comorbidities, etc.). The Wald chi-squared test was used to decide the inclusion of covariates in the model applying a backwards elimination process with  $p < 0.05$ . The gestational age at measurement was retained to control potential confounding effects.

The open source, freely available R statistical software (R version 3.1.1)<sup>22</sup> was used to conduct all the statistical analyses.

Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test for quantitative variables and Pearson's chi-squared test and McNemar's test for unpaired and paired proportions, respectively.

## RESULTS

A total of 381 pregnancies with suspected early-onset PE satisfied the eligibility criteria during the study period. Seventeen twin pregnancies and one pregnancy with incomplete data were excluded. To ensure a minimum interval between subsequent determinations of seven days, 152 subsequent samples were excluded. 51.8% of pregnancies had more than one assessment during the study period. Specifically, in pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38, 64.3% had evaluations at different gestational weeks. Distribution of number of samples per pregnancy is shown in figure S1. The final number was 363 women and 522 samples suitable for analysis (see Figure 1).

We considered samples with an sFlt-1/PIGF ratio alone of 38 or below as at low risk of developing PE within one week<sup>3</sup> (309 samples from 253 pregnancies) and developed

the predictive models with samples with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38 (213 samples from 123 pregnancies). Twelve pregnancies initially had an sFlt-1/PIGF ratio alone of 38 or below but subsequently rose above 38 and only one pregnancy did the opposite.

Of the 309 samples from 253 pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone of 38 or below, none developed early-onset PE. Conversely, 42.3% (52 of 123) of pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38 delivered with early-onset PE. However, only 22.1% (47 of 213 samples from 123 pregnancies) were diagnosed with early-onset PE leading to delivery within one week. Note that five pregnancies that delivered with early-onset PE did not have any blood test during the last week of pregnancy. Table 1 shows the epidemiological and clinical characteristics of the subcohort with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38, according to pregnancy outcome. Table S1 shows the epidemiological and clinical characteristics of the whole study population.

The majority of deliveries with PE were induced deliveries.

Description of NT-proBNP variation in pregnancies that developed PE has been described in a previous article<sup>13</sup>. NT-proBNP did not vary significantly during the considered gestational weeks in pregnancies that did not develop PE (Pearson correlation= -0.092 p= 0.149) (see Figure S2). In contrast, sFlt-1, PIGF and sFlt-1/PIGF ratio changed with gestational age.

#### **Individual gestational age-corrected marker models**

When assessing individual marker prediction performances combined with gestational age, we observed a significant difference between the AUC of the PIGF MoM model and

the AUC of the sFlt-1 MoM model ( $p < 0.001$ ), being lower the PIGF MoM model AUC (Figure 2). Each model AUC is detailed in Table 2.

### **Combined markers models**

#### **Addition of NT-proBNP to sFlt-1/PIGF ratio raw value**

The estimate of the AUC of the model that includes gestational age, sFlt-1/PIGF ratio raw value and NT-proBNP was significantly greater (DeLong test,  $p = 0.013$ ) than the estimate of the AUC of the model without NT-proBNP (Figure 3, left panel).

#### **Use of sFlt-1/PIGF ratio**

PIGF MoM was excluded from the MoM transformed marker model during its construction because of a lower prediction ability. We did not consider including sFlt-1/PIGF ratio MoM in the models as the inclusion of PIGF MoM was non-informative.

The estimate of the AUC of the model that combines gestational age, sFlt-1 MoM and NT-proBNP was significantly greater ( $p = 0.031$ ) than the estimate of the AUC of the model without NT-proBNP (Figure 3, right panel). Therefore, the selected model for the prognostic prediction tool included gestational age, sFlt-1 MoM and NT-proBNP. Parameters of the selected model are described in Table S3 (supplementary materials).

The prognostic prediction tool is freely available at <http://sbpssoftware.com/peprogntool>

The AUC of the model that combines gestational age, sFlt-1/PIGF ratio raw value and NT-proBNP was slightly greater than the selected model (gestational age and sFlt-1 MoM and NT-proBNP), however no significant differences were observed ( $p = 0.648$ ).

Conversely, the AUC of the selected model was greater than the AUC of the model that combines gestational age and sFlt-1/PIGF ratio raw value ( $p= 0.044$ ).

### **Subgroup analysis**

Prediction ability (AUC comparison) of the model that combines gestational age and sFlt-1 MoM and NT-proBNP did not differ from the model without NT-proBNP in pregnancies with intrauterine growth restriction ( $p= 0.200$ ) or chronic hypertension ( $p= 0.361$ ) (see Figure S3).

### **Model performance**

When considering determinations with sFlt-1/PIGF ratio alone above 38 (213 samples from 123 pregnancies), the model that combines gestational age, sFlt-1 MoM and NT-proBNP reached a detection rate of 59.6% at a 5% false positive rate cutoff level, which was significantly greater ( $p= 0.001$ ) than the model without NT-proBNP (31.9%). At this cutoff level, the likelihood ratio of a positive test was 12.4 (95% CI: 6.0-25.3). In other words, the odds of developing the event was increased twelvefold when the prognostic prediction tool result was positive.

When considering all included determinations, independently from the sFlt-1/PIGF ratio alone (522 samples from 363 pregnancies), the false positive rate of the application of the criterion based on the elevated sFlt-1/PIGF ratio alone (cutoff value of 38) have been reduced from 34.9% (166/475) to 1.5% with the application of the severely elevated sFlt-1/PIGF ratio alone (cutoff value of 655) (7/475) and 1.7% with the application of the prognostic prediction tool (8/475) to pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38, at the expense of a detection rate reduction from 100% (47/47) to 31.9 % (15/47) and 59.6%, (28/47) respectively. On the other hand, the positive predictive value of the

application of the elevated sFlt-1/PIGF ratio alone criterion has been increased from 22.1% (47/213) to 68.2% with the application of the severely elevated sFlt-1/PIGF ratio alone criterion (15/22) and 77.8% with the application of the prognostic prediction tool (28/36) (see Table 3). The severely elevated sFlt-1/PIGF ratio alone criterion showed a similar false positive rate to that of the prognostic prediction tool (1.7 vs 1.5 p=0.739). Conversely, the detection rate obtained by the severely elevated sFlt-1/PIGF ratio alone criterion is lower than the detection rate obtained by the prognostic prediction tool (31.9 vs 59.6% p=0.002). Even when the same false positive rate is used for both tests, the detection rate differences remain significant (31.9 vs 55.3% p=0.008).

33.9% of samples (177/522) had an elevated sFlt-1/PIGF ratio alone and a negative result of the selected model. 10.7% (19/177) of them developed early-onset PE leading to delivery within one week.

## **DISCUSSION**

Repeated assessments are frequent when early-onset preeclampsia is suspected, particularly in pregnancies with sFlt-1/PIGF ratio alone above 38. Considering repeated assessments, an sFlt-1/PIGF ratio alone of 38 or below adequately ruled out early-onset PE within one week. However, when the sFlt-1/PIGF ratio alone is above 38, the combination of NT-proBNP and sFlt-1 MoM and gestational age reduced the false positive rate of sFlt-1/PIGF ratio predicting short-term delivery as result of early-onset PE and it improved the prediction performance compared to a model based on the sFlt-1/PIGF ratio and also compared to higher sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff values.

A study by Verlohren et al.<sup>23</sup> identified the cutoff value of 655 for the sFlt-1/PIGF ratio alone (severely elevated), which was associated with early-onset PE leading to imminent

delivery (within 48h). A more recent publication<sup>24</sup> did not confirm the clinical relevance of the previously described cutoff value. The present study does not support the use of the sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff of 655, because only 31.9% of pregnancies delivered within a week with the diagnosis of early-onset PE. In comparison with the sFlt-1/PIGF ratio alone 655 cutoff contingent strategy, the prognostic prediction tool obtains a higher detection rate, at a similar false positive rate.

The main limitations of this study are the relative low number of cases with early-onset PE (47 cases), and that the prediction performance of this algorithm has been tested in the same population from which it was derived. Thereby, our results should be considered with caution and validated in a larger cohort to ascertain the value of the proposed model as a confirmatory test. However, the actual sample size has been sufficient to prove the superiority of adding NT-proBNP to the model and showed the detection rate reduction associated with the use of the sFlt-1/PIGF ratio model or the sFlt-1/PIGF ratio alone higher cutoff values.

The advantage of using the sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff level at 38 is the ease of interpretation if it is negative. Repeated sFlt-1/PIGF ratio alone determinations of 38 or below adequately rule out early-onset PE leading to delivery within one week. This means that ambulatory management and repeated PE markers assessment in one week seems a safe approach if suspicion persists, as no event has been observed in this group (309 assessments). On the other hand, pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38 require a more complex assessment as this cutoff value has a high false positive rate (35.0%).

We propose a contingent strategy in which gestational age, sFlt-1 MoM and NT-proBNP are combined. The reason for not including sFlt-1/PIGF ratio in the model is that after selecting pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38, gestational age-adjusted PIGF predictive ability is suboptimal and inferior than gestational age-adjusted sFlt-1. The association of sFlt-1 levels and preeclampsia prognosis is consistent with reported series by Baltajian<sup>25</sup> et al and Peguero et al<sup>26</sup>. Besides, the ratio between markers with unequal discriminatory power is likely to be misleading and suboptimal<sup>27-28</sup>.

Although the unavoidable detection rate loss (40% compared with sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff of 38), the low false positive rate (1.7%) of the PE prediction tool enables the identification of a group of high-risk pregnancies and may allow treatment of pregnancies with a positive result of a prognostic prediction tool (positive predictive value = 77.8%), with low risk of iatrogenic consequences. This may indicate an induced delivery and planning of adequate maternal and neonatal care. Moreover, existing guidelines agree in the use of antenatal corticosteroids to enhance fetal lung maturity before 34 weeks' gestation if delivery is likely to be within the next 7 days<sup>29</sup>. No position can be recommended to pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio alone above 38 and a negative result of the prognostic prediction tool, because 10.7% (19/177) delivered within one week as result of early-onset PE.

Although there is a need for PE prognostic markers, the usual study designs that only consider one test per pregnancy may not identify them. For instance, Verlohren et al.<sup>30</sup> assessed the role of NT-proBNP for predicting PE using regression analysis, and their results were not conclusive.

Maternal cardiac biophysical parameters have also been reported as predictors of severe forms of PE<sup>31</sup>. Therefore, future studies designed to address early-onset PE prognosis and management should consider including NT-proBNP and the use of study designs that allow repeated measurements.

Pregnancies with intrauterine growth restriction or chronic hypertension may require specific or adjusted prognosis assessment, which was not possible in this study.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors greatly appreciate Dr. Jordi Ponce's comments and methodologic assessment.

### **REFERENCES**

1. Schutte J, Steegers E, Schuitemaker N, Santema J, de Boer K, Pel M, et al. Rise in maternal mortality in the Netherlands. *BJOG*. 2010; 117: 399 – 406.
2. Tranquilli AL, Brown MA, Zeeman GG, Dekker G, Sibai BM. The definition of severe and early-onset preeclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Pregnancy Hypertens*. 2013; 3:44–47.
3. Zeisler H, Lurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive value of the sFlt-1/PIGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Eng J Med*. 2016; 374: 13 – 22.
4. Schoofs K, Grittner U, Engels T, Pape J, Denk B, Henrich W, et al. The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PIGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med*. 2014 Jan;42(1):61-8.

5. Sabrià E, Lequerica-Fernández P, Lafuente P, Ángeles EE, Escudero AI, Martínez-Morillo E, et al. Use of the sFlt-1/PIGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56: 303 – 311.
6. Herraiz I, Llurba E, Verlohren S, Galindo A: Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2018;43:81-89.
7. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res*. 2000; 47: 38 – 48.
8. Seong WJ, Kim SC, Hong DG, Koo TB, Park IS. Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in hypertensive disorders complicating pregnancy. *Hypertens Pregnancy*. 2011; 30: 287 – 294.
9. Álvarez-Fernández I, Prieto B, Rodríguez V, Ruano Y, Escudero AI, Álvarez FV. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and angiogenic biomarkers in the prognosis of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Clin Chim Acta*. 2016; 463: 150 – 157.
10. Afshani N, Moustaqim-Barrette A, Biccard BM, Rodseth RN, Dyer RA. Utility of B-type natriuretic peptides in preeclampsia: a systematic review. *Int J Obstet Anesth*. 2013; 22: 96 – 103.
11. Resnik JL, Hong C, Resnik R, Kazanegra R, Beede J, Bhalla V, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 450 – 454.
12. Johns MC, Stephenson C. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing in neonatal and pediatric patients. *Am J Cardiol*. 2008; 101: 76 – 81.
13. Sabrià E, Lequerica-Fernández P, Lafuente-Ganuzza P, Eguia-Ángeles E , Escudero AI, Martínez-Morillo E, et al. Addition of N-terminal pro-B natriuretic

- peptide to soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio > 38 improves prediction of pre-eclampsia requiring delivery within 1 week: a longitudinal cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018; 51: 758 – 767.
14. Sibai BM, Mercer BM, Schiff E, Friedman SA. Aggressive versus expectant management of severe preeclampsia at 28 to 32 weeks' gestation: a randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171(3):818–822.
  15. Odendaal HJ, Pattinson RC, Bam R, Grove D, Kotze TJ. Aggressive or expectant management for patients with severe preeclampsia between 28-34 weeks' gestation: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 1990;76(6):1070–1075.
  16. Vigil-De Gracia P, Reyes Tejada O, Calle Miñaca A, Tellez G, Chon VY, Herrarte E, et al. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: the MEXPRES Latin Study, a randomized, multicenter clinical trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2013; 209(5): 425.e1–8.
  17. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension.* 2018 Jul;72(1):24-43.
  18. Gómez O, Figueras F, Fernández S, Bennasar M, Martínez JM, Puerto B, et al. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11–41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32: 128-132.
  19. Gestational hypertension and preeclampsia. ACOG Practice Bulletin No. 202. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2019;133:e1–25.
  20. Acharya G, Wilsgaard T, Berntsen GK, Maltau JM, Kiserud T. Reference ranges for serial measurements of umbilical artery Doppler indices in the second half of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 937– 944.

21. Zeger S L, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 1986; 42: 121 – 130.
22. R Development Core Team. R: A language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing 2009, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at: <http://www.R-project.org>. Accessed on 3/2/2015
23. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(1):58.e1–8.
24. Enengl S, Mayer RB, Le Renard P-E, Shebl O, Arzt W, Oppelt P. Retrospective evaluation of established cut-off values for the sFlt- 1/PIGF ratio for predicting imminent delivery in preeclampsia patients *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*(2020).
25. Baltajian K, Bajracharya S, Salahuddin S, Berg AH, Geahchan C, Wenger B, et al. Sequential plasma angiogenic factors levels in women with suspected preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: 89.e1-10.
26. Peguero A, Fernandez-Blanco L, Mazarico E, Benitez L, Gonzalez A, Youssef L, et al. Added prognostic value of longitudinal changes of angiogenic factors in early-onset severe preeclampsia: a prospective cohort study. *BJOG* 2020; <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16383>. 00: 1– 8.
27. Cuckle H. Rational and irrational ratios. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 48: 275 – 278.
28. Verlohren S and Stepan H. Re: Rational and irrational ratios. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017; 49: 157 – 160.
29. Gillon TE, Pels A, von Dadelszen P, MacDonell K, Magee LA. Hypertensive disorders of pregnancy: a systematic review of International Clinical Practice Guidelines. *PLoS One*. 2014;9:e113715.

30. Verlohren S, Perschel FH, Thilaganathan B, Dröge LA, Henrich W, Busjahn A, et al. Angiogenic Markers and Cardiovascular Indices in the Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension*. 2017 Jun;69(6):1192-1197.
31. Di Pasquo E, Ghi T, Dall’asta A, Angeli L, Fieni S, Pedrazzi G, et al. Maternal cardiac parameters can help in differentiating the clinical profile of preeclampsia and in predicting progression from mild to severe forms. *Am J Obstet Gynecol* 2019;221:633.e1-9.

## TABLES

**Table 1:** Demographic and clinical characteristics of the subcohort with an sFlt-1/PlGF ratio alone above 38 (123 women). Comparison is made between pregnancies with early-onset preeclampsia leading to delivery within one week from last measurement (outcome present) and pregnancies that did not (outcome absent). Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test for quantitative variables and Pearson’s chi-squared test for proportions, respectively.

Characteristic	Outcome present (n= 47)	Outcome absent (n= 76)	Significant difference (p< 0.05)
Number of measurements	1 (1-3)	1 (1-3)	No
Age (years)	32 (30-35)	35 (33-36)	No
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.7 (27.7-30.8)	28.63 (28.0-31.2)	No
Pre-existing diabetes, n (%)	1 (2.1%)	6 (7.8%)	No
Nulliparity, n (%)	40 (85.1%)	53 (69.7%)	No
In vitro fertilization, n (%)	3 (6.4%)	10 (13.2%)	No
PE in previous pregnancy, n (%)	1 (2.1%)	6 (7.9%)	No
Chronic hypertension, n (%)	6 (12.8%)	6 (7.9%)	No
Intrauterine growth restriction, n (%)	15 (31.9%)	36 (47.4%)	No

Platelets ( $10^3/\mu\text{l}$ )	201 (178-214)	226 (212-251)	Yes
Data at delivery			
GA (weeks)	32.0 (30.8-31.9)	34.5 (33.9-35.3)	Yes
Systolic BP (mmHg)	155 (148-160)	138 (133-143)	Yes
Diastolic BP (mmHg)	89 (86-92)	82 (80-86)	Yes
Proteinuria	39 (83.0%)	27 (35.5%)	Yes
Reason for suspected preeclampsia <sup>§</sup>			
New-onset hypertension	33 (70.2%)	32 (42.1%)	Yes
Worsening of chronic hypertension	4 (8.5%)	6 (7.9%)	No
New-onset proteinuria	33 (68.1%)	11 (14.5%)	Yes
Intrauterine growth restriction	14 (29.8%)	29 (38.2%)	No
Symptoms <sup>¶</sup>	3 (6.4%)	13 (17.1%)	No
Abnormal uterine perfusion	9 (19.1%)	20 (26.3%)	No

Data are given as median (interquartile range) or number (percentage %). §: There may have been more than one reason for suspected preeclampsia. ¶: The majority of symptoms were feet edema. GA, gestational age; BP, blood pressure.

**Table 2:** Area under the curve for prediction of delivery with early-onset preeclampsia for developed models in pregnancies with sFlt-1/PIGF ratio above 38 (213 samples from 123 pregnancies). 95% CI: 95% confidence interval. GA: gestational age.

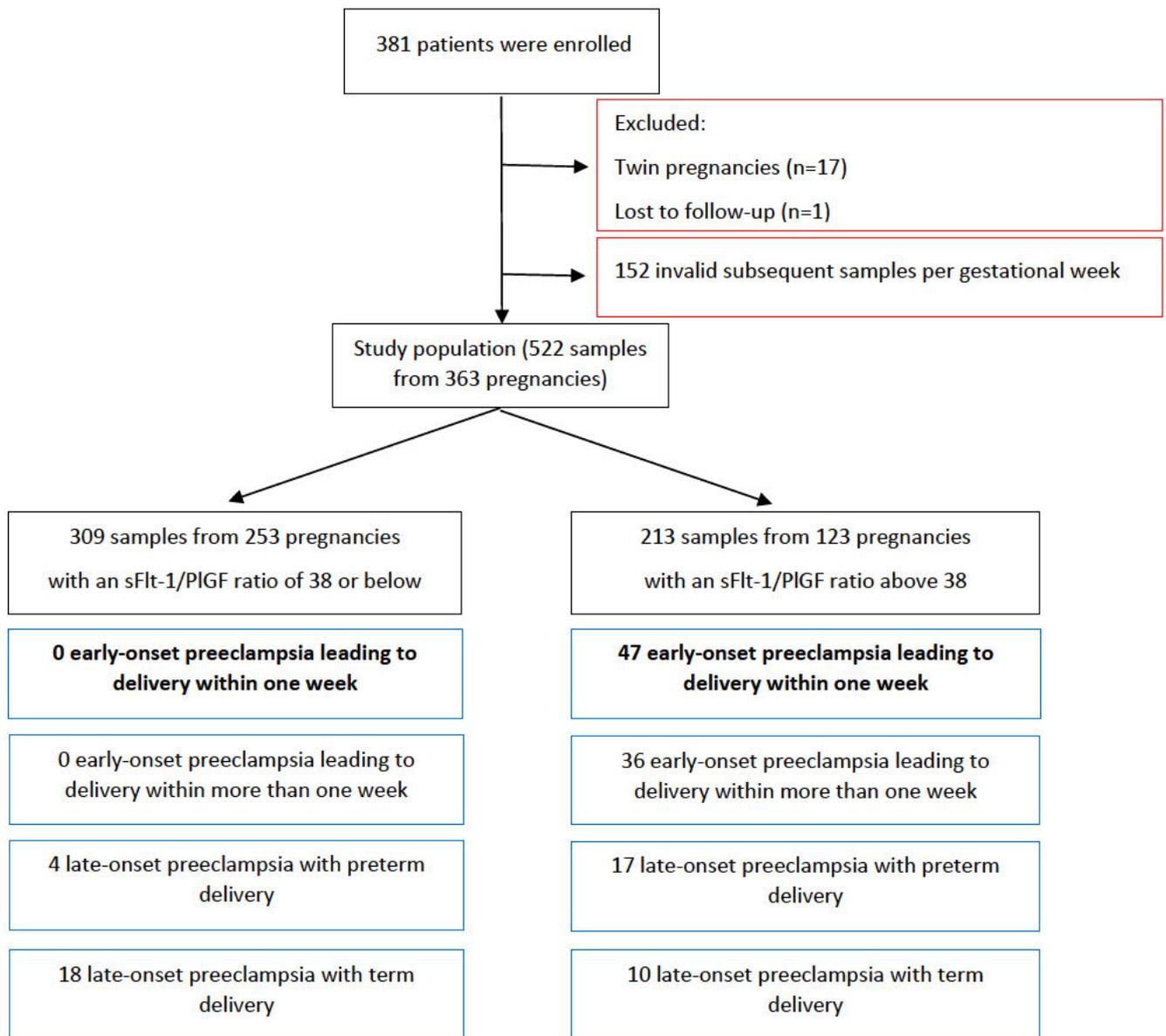
Model	Area under the curve	
	Estimate	95% CI
<b>GA + NT-proBNP</b>	0.853	0.784-0.914
<b>GA + sFlt-1 MoM</b>	0.835	0.766-0.898
<b>GA + PIGF MoM</b>	0.684	0.604-0.761
<b>GA + sFlt-1/PIGF ratio</b>	0.826	0.753-0.894
<b>GA + sFlt-1/PIGF ratio +NT-proBNP</b>	0.887	0.824-0.941
<b>GA + sFlt-1 MoM +NT-proBNP</b>	0.882	0.823-0.934

**Table 3:** Comparison of binary test performance of the sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff of 38 criterion and its combination with the sFlt-1/PIGF ratio alone cutoff of 655 criterion and the prognostic prediction tool using all the included population, independently from sFlt-1/PIGF ratio value (522 samples). Pregnancies with an sFlt-1/PIGF ratio of 38 or below have been considered as negative for the prognostic prediction tool. 95% CI: 95% confidence interval. DR: detection rate. FPR: false positive rate. PPV: positive predictive value. NPV: negative predictive value. PLR: positive likelihood ratio.

Measure of accuracy	sFlt-1/PIGF ratio > 38		sFlt-1/PIGF ratio > 655		Prognostic prediction tool	
	Estimate	95% CI	Estimate	95% CI	Estimate	95% CI
<b>Positivity</b>	40.8%	36.5 - 45.1	4.2%	2.7 - 6.3	6.9%	4.9-9.4
<b>DR</b>	100%	92.4 - 100	31.9%	19.1 - 47.1	59.6%	44.3-73.6
<b>FPR</b>	35.0%	34.6 - 39.3	1.5%	0.6 – 3.0	1.7%	0.7-3.3
<b>PPV</b>	22.1%	16.3 - 27.9	68.2%	45.1 – 86.1	77.8%	60.8-89.9
<b>NPV</b>	100%	98.8 - 100	93.6%	91.2 – 95.6	96.1%	94.0-97.6
<b>PLR</b>	2.9	2.5 - 3.2	21.7	9.3 - 50.5	35.4	17.1-73.1

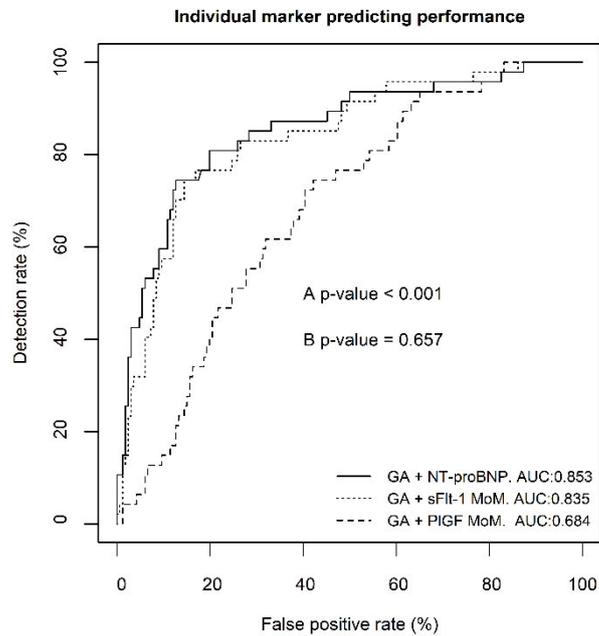
**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Inclusion-exclusion flow-chart.

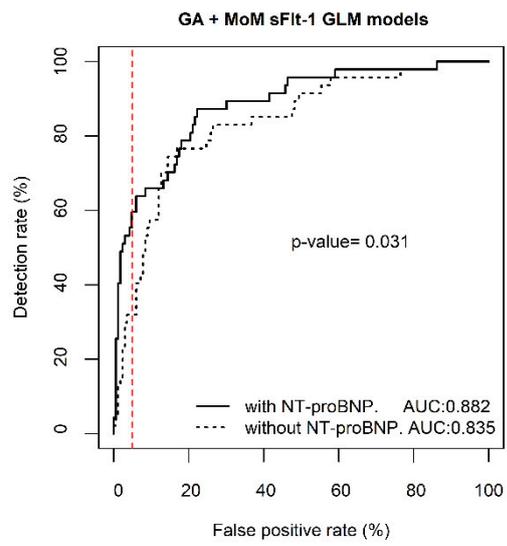
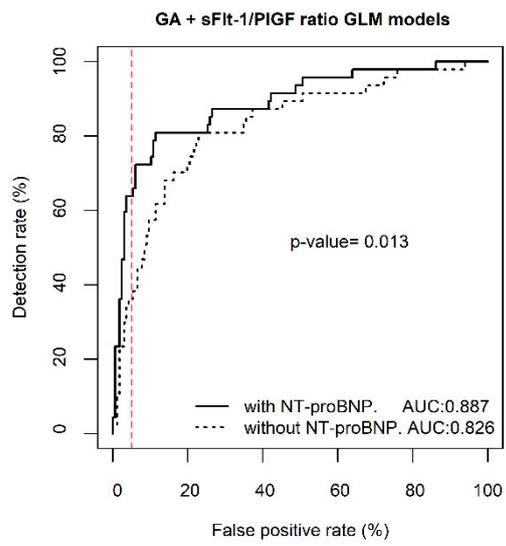


**Figure 2:** Receiver operating characteristics (ROC) curve for median risk predictions of early-onset preeclampsia leading to delivery within one week in 123 women (213 samples) with suspected early-onset preeclampsia and an sFlt-1/PIGF ratio above 38, using a linear mixed model based on individual markers and gestational age (GA). Significant differences between AUC estimates of the sFlt-1 MoM model (solid line) and the PIGF MoM model (dashed line) were observed, referred to as A p-value ( $p <$

0.001). While no differences were observed between the NT-proBNP (dotted line) and sFlt-1 MoM models, referred to as B p-value.



**Figure 3:** Receiver operating characteristics (ROC) curve for median risk predictions of early-onset preeclampsia leading to delivery within one week in 123 women (213 samples) with suspected early-onset preeclampsia and an sFlt-1/PIGF ratio above 38. The curves show the predictive performance of generalized linear mixed (GLM) models that combine gestational age (GA), and sFlt-1/PIGF ratio (left panel) and GA and sFlt-1 MoM (right panel) with NT-proBNP (solid line) and without NT-proBNP (dashed line). Vertical dashed red line indicates 5% false positive rate. Addition of NT-proBNP to both models significantly increases their predictive ability.



## 4. Discusión

Por su facilidad de uso, el punto de corte de 38 del cociente sFlt-1/PIGF es idóneo para definir un grupo de gestantes con sospecha clínica de preeclampsia y con bajo riesgo de complicaciones en una semana. Esta conclusión del estudio PROGNOSIS se confirma con la población estudiada y también evaluando el parto con diagnóstico preeclampsia como suceso de interés. Esto último indica el papel pronóstico de este marcador.

Las pacientes con sospecha clínica de preeclampsia y con el cociente sFlt-1/PIGF mayor de 38 requieren de un asesoramiento pronóstico más complejo. Los modelos desarrollados en esta tesis demuestran un mayor rendimiento diagnóstico que niveles de corte más elevados del cociente sFlt-1/PIGFs. Se ha demostrado que la adición de NT-proBNP a los modelos mejora los resultados para la predicción de parto en una semana debido a preeclampsia (antes de las 37 semanas de gestación) y preeclampsia precoz. Contrariamente, no se ha conseguido identificar el ácido úrico como marcador pronóstico. Esto puede ser debido a una correlación más débil, que este estudio, limitado por el tamaño de la muestra, no ha podido identificar. Tampoco se ha objetivado el beneficio de nuevas determinaciones de PIGF, una vez el cociente sFlt-1/PIGF es mayor de 38 y se sospecha una preeclampsia precoz. La exclusión del PIGF se ha demostrado que es debido a un bajo rendimiento diagnóstico comparado con los otros marcadores, entre las gestaciones con el cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.

### 4.1. Cociente sFlt-1/PIGF

En el primer artículo se ha comprobado la validez externa de los resultados del estudio PROGNOSIS. Se ha ratificado la reproducibilidad del punto de corte de 38 para descartar el diagnóstico de preeclampsia y parto debido a preeclampsia en una semana y se corresponde con el estudio original (valor predictivo negativo de 99.1 y 99.3% respectivamente). También se ha comprobado su papel predictivo a las 4 semanas. Debido a que en nuestra población se

ha observado una prevalencia de preeclampsia superior a la del estudio original, 25.6 y 12.9 %, respectivamente, el valor predictivo positivo es superior en nuestro estudio que en el de PROGNOSIS, pero la razón de verosimilitud positiva es equivalente 3.8 y 3.9, respectivamente. Incluso este punto de corte descarta adecuadamente la preeclampsia precoz en determinaciones realizadas antes de las 34 semanas, sin necesidad de repetirse semanalmente. En este artículo, también se observa que el cociente sFlt-1/PlGF aumenta en gestantes con RCIU aislado y en partos prematuros sin signos de insuficiencia placentaria.

En el segundo artículo se confirma el papel diferencial del cociente Flt-1/PlGF y NT-proBNP en pacientes con RCIU aislado en las 2 semanas previas al parto. La concentración de NT-proBNP se eleva en las 2 semanas previas al parto en la preeclampsia y no en RCIU aislado, mientras que el cociente sFlt-1/PlGF se eleva tanto en las gestaciones afectas de preeclampsia, como en RCIU y previamente a las 2 semanas previas al parto. Referente a las gestaciones con hipertensión crónica, las pacientes con preeclampsia sobreañadida no presentaban aumento significativo del cociente sFlt-1/PlGF en las últimas determinaciones, mientras que sí que había una elevación significativa del NT-proBNP.

Tanto sFlt-1, como PlGF, cambian su concentración a lo largo de gestaciones normales aumentando la concentración de sFlt-1 durante la gestación, mientras que disminuye la de PlGF. Por consiguiente, el cociente sFlt-1/PlGF aumenta de forma exponencial al final de la gestación (108). A pesar que estos hallazgos han sido constantes en la bibliografía, aún no se optado por expresar estos marcadores en forma de múltiplos de la mediana (MoM) de forma habitual, teniendo en cuenta que la expresión de los parámetros bioquímicos en MoM disminuye la variabilidad entre laboratorios y reactivos.

A continuación, se detallan las principales causas de falsos positivos del cocientes Flt-1/PlGF en la predicción de preeclampsia:

- El aumento del cociente sFlt-1/PIGF en preeclampsia se produce antes que otros marcadores como el NT-proBNP.
- El aumento del cociente sFlt-1/PIGF se eleva en casos de insuficiencia placentaria, concepto que incluye la preeclampsia, pero también el RCIU aislado. Esta última situación es una fuente de falsos positivos. En el segundo artículo el 51.4 % de las gestaciones afectas de RCIU aislado, no desarrollaron preeclampsia.
- En la hipertensión crónica, el daño endotelial preexistente puede reducir el umbral de disfunción placentaria necesaria para desencadenar la preeclampsia.
- La variación propia del cociente sFlt-1/PIGF en gestaciones normales y con insuficiencia placentaria hace que puntos de corte fijos para toda la gestación puedan ser adecuados inicialmente, pero ser inadecuados en fases finales de la gestación. Esta fuente de falsos positivos se puede resolver transformando los valores en MoM, propios de cada población.

Una vez establecida la población de riesgo mediante el punto de corte del cociente sFlt-1/PIGF en 38, el artículo 3 demuestra que el marcador PIGF en MoM presenta un rendimiento predictivo subóptimo e inferior a los otros marcadores, sFlt-1 y NT-proBNP. Debido a que el cociente entre marcadores con poder discriminativo desigual puede ser engañoso, subóptimo e innecesario, no se valora el cociente sFlt-1/PIGF como marcador predictivo de preeclampsia precoz.

Un estudio de Verlohren et al (101), identificó el cociente sFlt-1/PIGF superior a 655 estaba asociado a un parto inminente (en las siguientes 48 horas) en las pacientes con preeclampsia precoz. Una publicación más reciente (109) no pudo confirmar la relevancia clínica del punto de corte descrito. El tercer artículo no apoya el uso del punto de 655 del cociente sFlt-1/PIGF, ya que solo un 31.9% de estas gestaciones dieron a luz con el diagnóstico de preeclampsia precoz a la semana de la determinación. Comparando las dos estrategias contingentes la

herramienta predictiva desarrollada obtenía una mayor detección con una tasa de falsos positivos similar.

La razón para no incluir el cociente sFlt-1/PIGF en el modelo es que una vez seleccionadas las gestantes con un cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38 el PIGF ajustado por edad gestacional muestra un poder predictivo subóptimo e inferior a sFlt-1 ajustado por edad gestacional.

El uso de la concentración de sFlt-1 en MoM como único marcador pronóstico en preeclampsia precoz de los factores angiogénicos, es congruente con los hallazgos descritos en la bibliografía. Recientemente, Peguero et (110) al demuestran que únicamente cambios longitudinales en la concentración de sFlt-1 están relacionados con la aparición de complicaciones, en una cohorte de 63 gestantes afectas de preeclampsia precoz. Además, los cocientes entre marcadores con poder discriminante desigual son probablemente engañosos y subóptimos (111,112).

#### 4.2. NT-proBNP

Se ha evidenciado que su determinación mejora la predicción a corto plazo de la necesidad de finalización del embarazo debido a preeclampsia, en comparación con el cociente sFlt-1/PIGF cuando éste es mayor de 38. El NT-proBNP también mejora la predicción a corto plazo de la necesidad de finalización del embarazo debido a preeclampsia precoz en gestaciones con cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.

El NT-proBNP es producido por el miocito en respuesta al estiramiento del miocárdico inducido por la sobrecarga de volumen ventricular o la isquemia. La función fisiológica del péptido natriurético es aliviar esta carga de trabajo, aumentando la natriuresis, la diuresis, la permeabilidad capilar y relajando los vasos periféricos. Su concentración en suero se ha correlacionado con el pronóstico de la insuficiencia ventricular. Por ello, se utiliza en la práctica clínica para evaluar las disfunciones ventriculares y la insuficiencia cardíaca (113). Las

alteraciones vasculares (disminución del gasto cardíaco, incremento de la presión arterial, reducción del volumen plasmático, aumento de la resistencia vascular y vasoconstricción generalizada) que acontecen en la preeclampsia estimulan su producción. Existen varios estudios que correlacionan el NT- proBNP con el desarrollo, precocidad y gravedad de la preeclampsia (114,115), siendo reflejo de la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo que tiene lugar en la preeclampsia. Los niveles de NT-proBNP no se modifican a lo largo de gestaciones normales (116). Tampoco se ha descrito paso transplacentario del mismo (117).

Aunque existen evidencias de que la circulación fetal de gestaciones afectas de RCIU se encuentra elevada (118).

Lacovidou N y col. encontraron concentraciones plasmáticas de NT-proBNP en gestantes afectas de RCIU similares a los hallados en gestantes sanas (119). Así mismo, a pesar de que las gestaciones afectas de RCIU tienen un riesgo aumentado para desarrollar enfermedades cardiovasculares en la vida posnatal (120), apenas existen estudios que evalúen la función ventricular en las gestantes afectas de RCIU aislado. También se han descrito parámetros cardíacos biofísicos como predictores de formas severas de preeclampsia (121). Por ello, futuros estudios diseñados para evaluar el pronóstico de la preeclampsia precoz deberían incluir el NT-proBNP y otros parámetros de la función cardíaca materna.

### 4.3. PP-13

La proteína placentaria 13 no ha sido objeto de estudio en esta tesis doctoral. La mayoría de estudios sobre su rendimiento predictivo en preeclampsia son de primer trimestre. A pesar de ser la primera proteína que altera su concentración en las pacientes que desarrollarán preeclampsia, no ha demostrado su utilidad en ninguna revisión sistemática (48,122). Cabe destacar que la mayoría de estudios en que se ha valorado la PP13, ésta se determina entre las 11 y 13 semanas, donde el papel de PIGF es superior.

Un estudio realizado en el tercer trimestre destaca que, a pesar de mantener una expresión inhibida, se encuentran elevadas concentraciones de PP13 en suero de gestaciones con preeclampsia precoz respecto a los controles de la misma edad gestacional, debido a una mayor liberación de micropartículas del sincitiotrofoblasto. Esta liberación de micropartículas por el sincitiotrofoblasto que contienen PP13, puede ser la expresión bioquímica de una maduración acelerada de las vellosidades placentarias (43), hecho no observado en la preeclampsia tardía, lo cual apoyaría la teoría de etiopatogenias diferenciadas de las dos enfermedades. Esta proteína placentaria no ha sido valorada como predictora de preeclampsia precoz en el segundo y tercer trimestre de embarazo.

#### 4.4. Predicción pronóstica en preeclampsia

En el artículo segundo y tercero se han desarrollado herramientas de predicción pronóstica en preeclampsia, en general, y preeclampsia precoz, respectivamente. En el segundo artículo, se ha desarrollado un modelo GEE que estima el riesgo poblacional. En el tercer artículo, se ha desarrollado un modelo mixto, que estima un riesgo personal introduciendo un factor aleatorio a la estimación. La variabilidad de este factor variará de forma inversa a la precisión de las estimaciones.

#### 4.5. Limitaciones

Debido a tratarse de un estudio unicéntrico, con una muestra limitada por la duración del estudio, no se ha podido descartar que el ácido úrico sea un candidato como marcador pronóstico en estudios futuros. Tampoco, se ha podido asegurar la independencia del cociente sFlt-1/PlGF de la concentración de NT-proBNP, ya que la introducción de un factor de interacción en los modelos hubiera atentado contra la norma intuitiva de disponer de un mínimo de 10 casos por marcador introducido en la regresión múltiple. Esperemos que futuros estudios con muestras más amplias puedan demostrar esta independencia.

Cabe también destacar que el algoritmo analizado se ha examinado en la misma población en la que se ha desarrollado. Por los motivos expuestos, las conclusiones deben ser interpretadas con precaución y validadas externamente en una cohorte de mayor tamaño, para asegurar la utilidad del modelo como prueba confirmatoria. A pesar de ello, la medida de la muestra ha sido suficiente para demostrar la superioridad de añadir NT-proBNP al modelo y ha demostrado la reducción de la tasa de detección asociada con el uso de modelos basados exclusivamente en el cociente sFlt-1/PIGF o puntos de corte superiores del cociente sFlt-1/PIGF.

Las gestaciones afectas de RCIU e hipertensión crónica pueden requerir una herramienta de predicción del pronóstico de la preeclampsia precoz específica. El estudio descrito en el tercer artículo no pudo demostrar una mejor predicción en estos subgrupos, al añadir NT-proBNP al modelo, probablemente debido a insuficiente poder estadístico en análisis de subgrupos.

#### 4.6. Implicaciones

El objetivo de prolongar la duración de la gestación ante la sospecha clínica de preeclampsia precoz es la reducción de la morbilidad neonatal, por la reducción del número de partos pretérmino y su severidad. Este beneficio potencial está contrarrestado por las potenciales complicaciones maternas que ponen en peligro sus vidas. Se han realizado varios ensayos clínicos randomizados (81–83) para responder cuál es el riesgo que prevalece, sin una respuesta clara al respecto. Guías clínicas recientes (5) abogan en contra del uso clínico de los factores angiogénicos. Una mejor selección de las gestaciones en riesgo de complicaciones como la propuesta en la presente tesis, podría cambiar esta situación.

Actualmente la investigación en preeclampsia se centra, principalmente, en el uso del desequilibrio angiogénico para decidir la necesidad de finalización de la gestación. Los resultados de esta tesis doctoral aportan una nueva perspectiva con la que valorar la preeclampsia. Se ha identificado un nuevo marcador pronóstico de preeclampsia y se ha

desarrollado una herramienta de asesoramiento pronóstico para la preeclampsia precoz. Con ello se pretende sentar las bases, en cuanto a diseño de estudios y análisis estadístico, para la identificación y desarrollo de otros marcadores pronósticos. Nuestro objetivo es ayudar al clínico a identificar las gestantes tributarias de finalizar la gestación para reducir la morbilidad y mortalidad materna asociada a preeclampsia, sin aumentar la fetal.

Hemos observado que, ante la sospecha de preeclampsia precoz, son frecuentes las evaluaciones repetidas del cociente sFlt-1/PIGF, particularmente cuando esta es superior a 38. La ventaja de usar solamente el cociente sFlt-1/PIGF es la facilidad de interpretación si es menor a 38. Considerando determinaciones repetidas, el cociente sFlt-1/PIGF de 38 o menor descarta correctamente, en el plazo de una semana, el parto debido a preeclampsia precoz. Esto significa que el manejo ambulatorio y la repetición de marcadores de preeclampsia en una semana, si la sospecha clínica persiste, es una aproximación segura en estas gestantes. En el presente estudio, no se han observado eventos adversos en este grupo de gestantes (309 evaluaciones). Por otro lado, las gestaciones con cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38 requiere una evaluación más compleja, ya que este punto de corte tiene una alta tasa de falsos positivos (35%). Por este motivo, se han construido modelos que permiten múltiples evaluaciones por cada gestante con el cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38, restringidas a una determinación por semana gestacional.

En el segundo artículo, se ha observado una reducción de los falsos positivos en la predicción de parto con diagnóstico de preeclampsia a la semana tras la adición de NT-proBNP a un modelo GEE basado en el cociente sFlt-1/PIGF y la edad gestacional, en gestantes con sospecha clínica de preeclampsia y un cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38. Este modelo predictivo no es útil para la valoración del riesgo de cada paciente, ya que los modelos GEE no tienen en cuenta el efecto del azar en la distribución del riesgo y por ello determinan el riesgo a nivel poblacional.

La concentración de ácido úrico se encuentra significativamente elevado en las pacientes que desarrollan preeclampsia que conduce al parto durante la semana posterior a la determinación, respecto la que no lo hacen en sus distinta formas (concentración, z-score, z-score > 1 y z-score >2). A pesar de ello, su incorporación a un modelo predictivo no ha aportado mayor rendimiento del mismo. Por este motivo, el ácido úrico ha sido rechazado como marcador pronóstico de preeclampsia a lo largo de esta tesis.

En el tercer artículo, se ha desarrollado un modelo predictivo mixto (GLM) para la predicción pronóstica de preeclampsia precoz. Se observa que el rendimiento predictivo de preeclampsia precoz que conduce al parto en menos de una semana en gestantes sospecha clínica de preeclampsia precoz y cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38 es significativamente mejor para modelos GLM que combinan la edad gestacional con NT-proBNP o con sFlt-1 MoM, que con PIGF MoM (Figura 2 del tercer artículo). El uso de múltiples de la mediana para los marcadores sFlt-1 y PIGF se ha realizado al demostrar su variación a lo largo de gestaciones que no desarrollaron preeclampsia, contrariamente a lo que ocurre con el NT-proBNP. Además, durante la construcción de modelos predictivos que combinan varios marcadores, se ha rechazado la incorporación de PIGF MoM, por no aportar mayor rendimiento predictivo. Entre las gestaciones que presentan sospecha clínica de preeclampsia y un cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38, la combinación de NT-proBNP, el MoM de sFlt-1 y la edad gestacional identifica mejor a las gestantes que desarrollaran el parto con diagnóstico de preeclampsia precoz durante la semana posterior a la evaluación, comparado con un modelo análogo basado en el cociente sFlt-1/PIGF y con puntos de corte superiores del cociente sFlt-1/PIGF. Finalmente, se propone una estrategia contingente en la que se combinan la edad gestacional, MoM de sFlt-1 y NT-proBNP, en las gestaciones con sospecha clínica de preeclampsia precoz y cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38, pendiente de validación externa previa a su uso clínico, disponible en <http://sbpsoftware.com/peprogntool>. Se ha descartado el uso del cociente sFlt-1/PIGF en el

modelo ya que implica la introducción de un marcador pronóstico de preeclampsia precoz subóptimo (PIGF MoM).

El ácido úrico no se ha valorado en como predictor de la preeclampsia precoz, al haberse descartado como marcador de preeclampsia, previamente.

Comparando el punto de corte de 38, del cociente sFlt-1/PIGF, con la herramienta de predicción del pronóstico de la preeclampsia precoz, hay una inevitable reducción en la tasa de detección cercana al 40%, ya que la primera tiene una detección del 100%. A pesar de ello, la baja tasa de falsos positivos de la herramienta de predicción del pronóstico de la preeclampsia precoz (1.7%) puede permitir en el futuro la identificación de gestaciones de alto riesgo en las que sea posible indicar su tratamiento con un bajo riesgo de yatrogenia, debido a que el valor predictivo de estas gestantes es alto (77.8%). El posible tratamiento a indicar es la inducción del parto y la planificación de una adecuada atención neonatal. Además, las guías clínicas existentes (94) están de acuerdo en la administración de corticoides para aumentar la madurez pulmonar fetal antes de las 34 semanas de gestación si se prevé el parto en los próximos 7 días. No podemos aconsejar ninguna actitud en las gestaciones con un cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38 y un resultado negativo utilizando la herramienta de predicción del pronóstico de la preeclampsia precoz, ya que 10.7% de estas gestantes parirán en el plazo de una semana como consecuencia de esta patología.

La descripción de un marcador de daño cardíaco como marcador pronóstico de la preeclampsia tiene repercusiones patogénicas importantes. La primera es que la severidad de la preeclampsia, no solamente depende del grado de insuficiencia placentaria, si no que varía con la susceptibilidad de cada mujer. Este hecho hace que el funcionamiento de este marcador sea más prometedor que el cociente sFlt-1/PIGF en las gestaciones afectas de hipertensión crónica y RCIU, donde hay una susceptibilidad diferenciada para la preeclampsia, por exceso y en el caso del RCIU aislado por defecto.

Identificar un marcador de daño cardíaco, como marcador pronóstico de preeclampsia es congruente con el hecho previamente descrito que la preeclampsia predispone las pacientes a desarrollar patología cardio-vascular al cabo de unos años. Existen varios trabajos que describen que gestantes con preeclampsia continúan con concentraciones elevadas de NT-proBNP entre 3-5 meses después del parto (114,123,124). También apoya la hipótesis que centra la patogenia de la preeclampsia en la predisposición cardiovascular materna, subrayando la necesidad de seguimiento a largo plazo de estas pacientes para prevenir la aparición de accidentes cardio-vasculares. Esta predisposición, es probablemente debida a la selección de la población a riesgo que se produce durante el embarazo siendo éste una prueba de esfuerzo que realiza el corazón de las mujeres.

#### 4.7. Cuestiones abiertas y perspectivas futuras

Previa al uso clínico de esta herramienta pronóstica de preeclampsia precoz, se requiere una validación externa de la misma. El rendimiento predictivo de esta herramienta se podrá mejorar principalmente, por dos vías. La primera, introduciendo nuevos marcadores pronósticos independientes. Al tener que ser independientes, lo ideal es que estos marcadores se originen por vías patogénicas distintas al equilibrio angiogénico y daño cardíaco. Esto abre un campo de investigación de nuevos marcadores de la expresión clínica materna de la insuficiencia placentaria.

Teniendo en cuenta la secuencia de sucesos en la patogenia de la enfermedad, debiera reorientarse los esfuerzos de investigación al desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia no relacionados con la insuficiencia placentaria, para complementar la información aportada por el equilibrio angiogénico, haciendo hincapié en el uso de metodologías de análisis que permitan varias determinaciones por sujeto. Ejemplos:

- Estudios de marcadores de daño endotelial
- Estudios dinámicos y funcionales del corazón(121)

- Estudios de vascularización de la retina
- Excreción urinaria de moléculas y estudio de la función renal
- Estudios funcionales hepáticos
- Niveles séricos de estroncio
- MoM de PP13

Una segunda vía es la de personalizar la información obtenida con estos marcadores pronósticos, combinándola con el riesgo previo de cada paciente, obtenido en el cribado de preeclampsia del primer trimestre.

Para facilitar el avance de investigación en la preeclampsia, las sociedades científicas son responsables de establecer una definición homogénea para la preeclampsia, que sea inclusiva y generalizable. La dificultad de esta misión radica en encontrar el equilibrio entre estas dos características mutuamente excluyentes. Algunos autores proponen introducir en la definición de preeclampsia el uso de factores angiogénicos (125). Dado que, como se ha demostrado en esta tesis, el uso de estos factores está asociado a una elevada tasa de falsos positivos, estos autores proponen la sustitución por una definición más amplia insuficiencia placentaria en la que se entremezclan los casos de preeclampsia, con los RCIU aislado, como pacientes sin ninguna expresión clínica del desequilibrio angiogénico. La duda que plantea esta propuesta es que tratamiento se va a proponer a las pacientes que cumplan con esta definición.

Con la intención de que la definición sea lo más inclusiva posible, en los últimos años se ha revisado exhaustivamente los requerimientos clínicos mínimos necesarios para definir la preeclampsia. La proteinuria, que en 2001 era un parámetro imprescindible en definiciones posteriores se ha sustituido por otros criterios de gravedad, que en algunos casos nada tienen que ver con la sintomatología materna, como es el caso de RCIU (ISSHP 2014). Respecto al criterio de la hipertensión, recientemente se ha publicado un artículo que propone reducir los valores de tensión arterial requeridos (126). Con estos cambios se consigue aumentar el

número de gestaciones afectas de preeclampsia incluidas en la definición, pero al mismo tiempo se incluirán cuadros clínicos sin las mismas repercusiones pronósticas que la preeclampsia.

La principal utilidad de la definición de preeclampsia en el desarrollo de pruebas diagnósticas es ser usadas como referencia para valorar la efectividad de las mismas. Por este motivo, es muy importante haber demostrado el alto rendimiento de una prueba diagnóstica antes de incluirla en la definición misma de un cuadro clínico. En la actualidad, la alta tasa de falsos positivos de los factores angiogénicos no hace recomendable su inclusión en la definición del cuadro clínico.

Para valorar la efectividad de herramientas que predicen el pronóstico asociado a un proceso patológico, debería valorarse la necesidad de tratamiento. Por ejemplo, en la preeclampsia donde observamos un amplio abanico de complicaciones posibles, se puede valorar la necesidad de finalizar la gestación en un lapso de tiempo. Por este mismo motivo, en la presente tesis se ha evaluado el pronóstico de la preeclampsia, valorando la necesidad del parto a corto-medio plazo.

La definición de un proceso patológico puede tener otras utilidades. Si una vez ampliados los criterios de la definición de preeclampsia, usamos esta definición para indicar el único tratamiento descrito (finalización de la gestación) antes de las 37 semanas de gestación, pueden aumentar la yatrogenia y la morbilidad fetal asociada a la prematuridad, al finalizar mayor número de gestaciones prematuramente. Contrariamente, podemos usar la definición de preeclampsia para definir un grupo de gestaciones con riesgo de mal pronóstico materno y fetal. Esta función, que es compartida con el cribaje de preeclampsia del primer trimestre, puede servir para rescatar los casos no identificados con el cribaje que a lo largo de la gestación presentan clínica. Ante esta situación urge ofrecer al clínico una herramienta, sin

aumentar la iatrogenia, que informe del pronóstico de la gestación, para poder indicar si procede la finalización de la gestación.

Según la opinión del autor de esta tesis, la definición de preeclampsia debería ser exclusivamente clínica i basada en el pronóstico asociado a este proceso patológico. Esta definición se podría usar también para establecer un grupo de gestantes de riesgo, no identificadas con el cribaje de primer trimestre. Los distintos marcadores de preeclampsia deberían, en un segundo tiempo, usarse para establecer el pronóstico de estas gestantes. La indicación de finalizar una gestación con riesgo de preeclampsia debería establecerse por criterio clínico mientras estas herramientas no nos permitan establecer adecuadamente el pronóstico de la gestación, y distinguir cuadros clínicos con pronósticos fetales y maternos distintos que requieren de tratamientos diferentes. Además, esta definición no debería mezclar expresiones fetales, tales como el RCIU, con las maternas propias de la preeclampsia.

Los factores angiogénicos nos han permitido dar un paso adelante en la predicción pronóstica de las pacientes con síntomas de preeclampsia. Pero no podemos quedarnos en el uso del cociente sFlt-1/PlGF para determinar la conducta a seguir con estas gestaciones, habiendo herramientas disponibles sin un coste añadido significativo. Las futuras líneas de investigación determinaran que otros elementos se requieren para podernos hacer una idea adecuada de qué gestaciones van a desarrollar complicaciones, tal y como ha sucedido con el cribaje de preeclampsia en el primer trimestre.

Otra cuestión que queda por establecer es la fisiopatología de la preeclampsia, entendida como expresión clínica materna de la insuficiencia placentaria. Como se ha expuesto en la introducción hay pocas certezas en la fisiopatología de la preeclampsia. Principalmente, queda por establecer si el desencadenante del cuadro clínico es una placentación anómala en el primer trimestre o una mala adaptación cardiovascular materna al embarazo. Para añadir dudas sobre esta cuestión, recientemente un metaanálisis pone en duda la segunda hipótesis

basándose en la ausencia de aumento de incidencia de preeclampsia en las gestaciones afectas de cardiopatía, exceptuando la estenosis aórtica (127). Personalmente, debido a que encuentro dificultoso conocer exhaustivamente los mecanismos etiopatogénicos, creo más productivo centrar las líneas de investigación en buscar la combinación de marcadores que permitan un asesoramiento pronóstico de estas pacientes, siempre y cuando el mecanismo subyacente de funcionamiento de estos marcadores tenga una explicación patogénica plausible, que no se haya descartado de forma fehaciente.

Establecer si la preeclampsia precoz (la que se presenta antes de las 34 semanas de gestación) tiene una patogenia diferenciada de la preeclampsia prematura (la que sucede entre las 34 y 37 semanas de gestación), es una discusión interesante, pero a la que no se ha pretendido dar respuesta en esta tesis. En el tercer artículo, hemos focalizado la atención en la preeclampsia precoz porque es la que concentra mayor morbilidad y mortalidad materna y porqué en estas gestaciones la aplicación del único tratamiento existente, que es la finalización de la gestación, causa mayor repercusión neonatal en forma de prematuridad y morbilidad asociada. Por este motivo, las líneas de investigación futuras deberían concentrar los esfuerzos en la predicción de la preeclampsia precoz. En este subtipo de preeclampsia, se ha visto que tanto los marcadores bioquímicos, como el cribaje de primer trimestre, tienen una mayor capacidad predictiva.

#### 4.8. Desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia

El uso de diseños de estudios longitudinales (medidas repetidas), con las aproximaciones estadísticas usadas en esta tesis se pueden utilizar para la identificación y desarrollo de marcadores pronósticos de preeclampsia, como los marcadores de disfunción endotelial. Las nuevas líneas de investigación deberán considerar este tipo de aproximación estadística, con medidas repetidas, si se desea no desaprovechar recursos ni marcadores candidatos en la predicción pronóstica a corto plazo. Contrariamente, hay la posibilidad de descartar

marcadores candidatos por tener un comportamiento propio de marcador agudo. Eso es, el que modifica su valor justo antes de la aparición del suceso.

## 5. Conclusiones

- 5.1. En las gestantes con sospecha clínica de preeclampsia, el cociente sFlt-1/PIGF menor o igual a 38 descarta el parto debido a preeclampsia a la semana de la determinación.
- 5.2. En las gestantes con sospecha clínica de preeclampsia y un cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38, el cociente sFlt-1/PIGF y la concentración de NT-proBNP son marcadores de parto a la semana debido a preeclampsia. La elevación del cociente sFlt-1/PIGF es previa a la elevación de la concentración de NT-proBNP.
- 5.3. PIGF MoM es un predictor subóptimo del parto a la semana debido a preeclampsia precoz en gestantes con sospecha clínica y cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.
- 5.4. NT-proBNP y sFlt-1 MoM son predictores del parto a la semana debido a preeclampsia precoz en gestantes con sospecha clínica y cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.
- 5.5. La combinación de NT-proBNP, sFlt-1 MoM predice mejor que el cociente sFlt-1/PIGF el parto a la semana debido a preeclampsia precoz, en gestantes con sospecha clínica y cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38.
- 5.6. Estudios con medidas repetidas permiten identificar marcadores agudos de disfunción endotelial.
- 5.7. Se ha desarrollado una herramienta confirmación en la sospecha clínica de preeclampsia precoz preeclampsia con el cociente sFlt-1/PIGF mayor a 38 que puede tener una aplicación clínica.

## 6. Bibliografía

1. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A review. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2009;9:8.
2. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Assche A van, Moutquin J-M. The Classification and Diagnosis of the Hypertensive Disorders of Pregnancy: Statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy*. 2001;20(1):IX-XIV.
3. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014 Apr;4(2):97-104.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1122-1131.
5. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice. *Hypertension*. 2018;72(1):24-43.
6. Brown MA, Mangos G, Davis G, Homer C. The natural history of white coat hypertension during pregnancy. *BJOG*. 2005;112(5):601-6.
7. Saudan P, Brown MA, Buddle ML, Jones M. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *BJOG*. 1998;105(11):1177-84.
8. Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension*. 2009;53(6):944-51.
9. Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P, et al. Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: Results from cohort study. *British Medical Journal*. 2003;326(7394):845-9.
10. Wikström AK, Haglund B, Olovsson M, Lindeberg SN. The risk of maternal ischaemic heart disease after gestational hypertensive disease. *BJOG*. 2005;112(11):1486-91.
11. Theilen LH, Fraser A, Hollingshaus MS, Schliep KC, Varner MW, Smith KR, et al. All-Cause and Cause-Specific Mortality after Hypertensive Disease of Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2016;128(2):238-44.
12. Theilen LH, Meeks H, Fraser A, Esplin MS, Smith KR, Varner MW. Long-term mortality risk and life expectancy following recurrent hypertensive disease of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;219(1):107.e1-107.e6.
13. Tooher J, Thornton C, Makris A, Ogle R, Korda A, Horvath J, et al. Hypertension in pregnancy and long-term cardiovascular mortality: A retrospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jun 1;214(6):722.e1-722.e6.
14. Brown MA, Mackenzie C, Dunsmuir W, Roberts L, Ikin K, Matthews J, et al. Can we predict recurrence of pre-eclampsia or gestational hypertension? *BJOG*. 2007;114(8):984-93.
15. van Oostwaard MF, Langenveld J, Schuit E, Papatsonis DNM, Brown MA, Byaruhanga RN, et al. Recurrence of hypertensive disorders of pregnancy: An individual patient data metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 May 1;212(5):624.e1-624.e17.
16. Espinoza J, Romero R, Yeon MK, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*. 2006; 34(6): 447-458.

17. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1967;93(2):569–79.
18. Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013 Oct;34(5):981-1023.
19. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(5):1200–4.
20. Harris LK, Benagiano M, D’Elios MM, Brosens I, Benagiano G. Placental bed research: II. Functional and immunological investigations of the placental bed. *Am J Obstet Gynecol*. 2019;221(5):457–69.
21. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The “great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Mar; 204(3): 193–201.
22. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and gynecology annual*. 1972;1:177–91.
23. Khong TY, de Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1986;93(10):1049–59.
24. Dommissie J, Tiltman AJ. Placental bed biopsies in placental abruption. *BJOG*. 1992;99(8):651–4.
25. Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. *Am J Obstet Gynecol*. 2019;221(5):437–56.
26. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187(5):1137-1142.
27. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human Reproduction Update*. 2012 Jul;18(4):436-57.
28. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology*. 2006;8(11):1223–34.
29. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care*. 2010;14(5):R182.
30. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, de Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor. *Nat Med*. 2001/05/01. 2001 May;7(5):575–83.
31. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Laboratory Investigation*. 1997 Apr;76(4):517–31.
32. Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, et al. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(3):H1381-7.
33. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(5):649–58.
34. Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M. Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*. 2014 Feb;35 Suppl:S93-9.

35. Hoeller A, Ehrlich L, Golic M, Herse F, Perschel FH, Siwetz M, et al. Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies. *Hypertens Pregnancy*. 2017;36(2):151-160.
36. Ehrlich L, Hoeller A, Golic M, Herse F, Perschel FH, Henrich W, et al. Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2017;36(2):175-185.
37. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8):a011056.
38. Bohn H, Kraus W, Winckler W. Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17). *Oncodev Biol Med*. 1983;4(5):343-350.
39. Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegi B, Than GN, Bohn H. Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Engineering*. 2001;14(11):875–80.
40. Gizurarson S, Sigurdardóttir ER, Meiri H, Huppertz B, Sammar M, Sharabi-Nov A, et al. Placental Protein 13 Administration to Pregnant Rats Lowers Blood Pressure and Augments Fetal Growth and Venous Remodeling. *Fetal Diagn Ther*. 2016;39(1):56-63.
41. Gizurarson S, Huppertz B, Osol G, Skarphedinsson JO, Mandala M, Meiri H. Effects of placental protein 13 on the cardiovascular system in gravid and non-gravid rodents. *Fetal Diagn Ther*. 2013;33(4):257-264.
42. Drobňjak T, Gizurarson S, Gokina NI, Meiri H, Mandalá M, Huppertz B, et al. Placental protein 13 (PP13)-induced vasodilation of resistance arteries from pregnant and nonpregnant rats occurs via endothelial-signaling pathways. *Hypertens Pregnancy*. 2017;36(2):186-195.
43. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, et al. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch*. 2008;453(4):387-400.
44. Sammar M, Nisemblat S, Fleischfarb Z, Golan A, Sadan O, Meiri H, et al. Placenta-bound and body fluid PP13 and its mRNA in normal pregnancy compared to preeclampsia, HELLP and preterm delivery. *Placenta*. 2011;32 Suppl:S30-S36.
45. Huppertz B, Sammar M, Chefetz I, Neumaier-Wagner P, Bartz C, Meiri H. Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia. *Fetal Diagn Ther*. 2008;24(3):230-236.
46. Gonen R, Shahar R, Grimpel YI, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, et al. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: A prospective longitudinal study. *BJOG*. 2008 Nov;115(12):1465–72.
47. Schneuer FJ, Nassar N, Khambalia AZ, Tasevski V, Ashton AW, Morris JM, et al. First trimester screening of maternal placental protein 13 for predicting preeclampsia and small for gestational age: In-house study and systematic review. *Placenta*. 2012 Sep;33(9):735–40.
48. Zhong Y, Zhu F, Ding Y. Serum screening in first trimester to predict pre-eclampsia, small for gestational age and preterm delivery: Systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2015 Aug 25;15(1).
49. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-442.

50. Hagmann H, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA, Stepan H. The promise of angiogenic markers for the early diagnosis and prediction of preeclampsia. *Clin Chem.* 2012;58(5):837-845.
51. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(1):40-49.
52. Huppertz B. Biology of preeclampsia: Combined actions of angiogenic factors, their receptors and placental proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(2):165349.
53. Falco ML, Sivanathan J, Laoreti A, Thilaganathan B, Khalil A. Placental histopathology associated with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 ;50(3):295-301.
54. Perry H, Khalil A, Thilaganathan B. Preeclampsia and the cardiovascular system: An update R. *Trends Cardiovasc Med.* 2018;28(8):505-513.
55. Gurgel Alves JA, Praciano De Sousa PC, Bezerra Maia E Holanda Moura S, Kane SC, da Silva Costa F. First-trimester maternal ophthalmic artery Doppler analysis for prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(4):411-418.
56. Kalafat E, Laoreti A, Khalil A, da Silva Costa F, Thilaganathan B. Ophthalmic artery Doppler for prediction of pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018 ;51(6):731-737.
57. Zamudio S, Borges M, Echalar L, Kovalenko O, Vargas E, Torricos T, et al. Maternal and Fetoplacental Hypoxia Do Not Alter Circulating Angiogenic Growth Effectors During Human Pregnancy<sup>1</sup>. *Biol Reprod.* 2014;90(2):42.
58. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: Novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1356-1370.
59. Failla CM, Carbo M, Morea V. Positive and negative regulation of angiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-1. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1306.
60. Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CHH, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2005 May;54(5):666-72.
61. Shantha Kumara HMC, Cabot JC, Yan X, Herath SAC, Luchtefeld M, Kalady MF, et al. Minimally invasive colon resection is associated with a persistent increase in plasma PIGF levels following cancer resection. *Surg Endosc.* 2011;25(7):2153-2158.
62. Meng Q, Duan P, Li L, Miao Y. Expression of placenta growth factor is associated with unfavorable prognosis of advanced-stage serous ovarian cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2018;244(4):291-296.
63. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int. J. Cancer,* 98: 14-18.
64. Scheufler KM, Drevs J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG, et al. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(1):99-110.
65. Dumnicka P, Sporek M, Mazur-Laskowska M, Ceranowicz P, Kuźniewski M, Drożdż R, et al. Serum soluble fms-like tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) predicts the severity of acute pancreatitis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):2038.

66. Chelli D, Hamdi A, Saoudi S, Jenayah AA, Zagre A, Jguerim H, et al. Clinical Assessment of Soluble FMS-Like Tyrosine Kinase-1/Placental Growth Factor Ratio for the Diagnostic and the Prognosis of Preeclampsia in the Second Trimester. *Clin Lab*. 2016;62(10):1927-1932.
67. Medinger M, Halter J, Heim D, Buser A, Gerull S, Stern M, et al. Angiogenic markers in plasma cell myeloma patients treated with novel agents. *Anticancer Research*. 2015;35(2):1085–90.
68. Crispi F, Llurba E, Domínguez C, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;31(3):303–9.
69. Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic JP, Yeo L, et al. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med*. 2011;39(6):641-652.
70. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG, Al-Rubaie ZTA, Askie LM, et al. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *The BMJ*. 2016;353.
71. Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: Risk factors and outcomes associated with early-versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(6):544.e1-544.e12.
72. Wright D, Syngelaki A, Akolekar R, Poon LC, Nicolaides KH. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal characteristics and medical history. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(1):62.e1-62.e10.
73. Zetterström K, Lindeberg SN, Haglund B, Hanson U. Maternal complications in women with chronic hypertension: A population-based cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005;84(5):419-424.
74. Kalafat E, Thilaganathan B. Cardiovascular origins of preeclampsia. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017;29(6):383-389.
75. Borges VTM, Zanati SG, Peraçoli MTS, Poiati JR, Romão-Veiga M, Peraçoli JC, et al. Maternal left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide concentration in early- and late-onset pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(4):519–23.
76. Hamad RR, Larsson A, Pernow J, Bremme K, Eriksson MJ. Assessment of left ventricular structure and function in preeclampsia by echocardiography and cardiovascular biomarkers. *J Hypertens*. 2009;27(11):2257-2264.
77. Homer CSE, Brown MA, Mangos G, Davis GK. Non-proteinuric pre-eclampsia: A novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens*. 2008;26(2):295-302.
78. Mateus J, Newman R, Sibai B, Li Q, Barton J, Combs C, et al. Massive Urinary Protein Excretion Associated with Greater Neonatal Risk in Preeclampsia. *AJP Rep*. 2017;7(1):e49-e58.
79. Chan P, Brown M, Simpson JM, Davis G. Proteinuria in pre-eclampsia: how much matters? *BJOG*. 2005 Mar;112(3):280–5.
80. Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O’Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, et al. Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia. *N Engl J Med*. 2017;377(7):613-622.
81. Sibai BM, Mercer BM, Schiff E, Friedman SA. Aggressive versus expectant management of severe preeclampsia at 28 to 32 weeks’ gestation: A randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(3):818–22.
82. Odendaal HJ, Pattinson RC, Bam R, Grove D, Theunis TJ, Kotze W. Aggressive or expectant management for patients with severe preeclampsia between 28- 34 weeks gestation: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 1990;76(6):1070–5.

83. Vigil-De Gracia P, Reyes Tejada O, Calle Miñaca A, Tellez G, Chon VY, Herrarte E, et al. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: The MEXPRES Latin Study, a randomized, multicenter clinical trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(5):425.e1-425.e4258.
84. Lam M, Dierking E. Intensive Care Unit issues in eclampsia and HELLP syndrome. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2017;7(3):136-141.
85. Koopmans CM, Bijlenga D, Groen H, Vijgen SM, Aarnoudse JG, Bekedam DJ, et al. Induction of labour versus expectant monitoring for gestational hypertension or mild pre-eclampsia after 36 weeks' gestation (HYPITAT): a multicentre, open-label randomised controlled trial. *Lancet.* 2009;374(9694):979-988.
86. O'Gorman N, Wright D, Poon LC, Rolnik DL, Syngelaki A, Wright A, et al. Accuracy of competing-risks model in screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;49(6):751–5.
87. Scaccocchio E, Figueras F, Crispi F, Meler E, Masoller N, Mula R, et al. Performance of a first-trimester screening of preeclampsia in a routine care low-risk setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(3):203.e1-203.e10.
88. Serra B, Mendoza M, Scaccocchio E, Meler E, Nolla M, Sabrià E, et al. A new model for screening for early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;222(6):608.e1-608.e18.
89. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive value of the sFlt-1:PIGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016;374(1):13–22.
90. Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2001;97(2):261–7.
91. Bian X, Biswas A, Huang X, Lee KJ, Li TK-T, Masuyama H, et al. Short-Term Prediction of Adverse Outcomes Using the sFlt-1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1)/PIGF (Placental Growth Factor) Ratio in Asian Women With Suspected Preeclampsia. *Hypertension.* 2019;74(1):164-172.
92. Lai J, Pinas A, Poon LCY, Agathokleous M, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A and free  $\beta$ -human chorionic gonadotrophin at 30-33 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(3):164-172.
93. Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol.* 2012;36(1):56-59.
94. Gillon TER, Pels A, von Dadelszen P, MacDonell K, Magee LA. Hypertensive disorders of pregnancy: A systematic review of international clinical practice guidelines. *PLoS One.* 2014;9(12):e113715.
95. O'Gorman N, Wright D, Syngelaki A, Akolekar R, Wright A, Poon LC, et al. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(1):103.e1-103.e12.
96. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2013;33(1):8–15.
97. Perales A, Delgado JL, de la Calle M, García-Hernández JA, Escudero AI, Campillos JM, et al. sFlt-1/PIGF for prediction of early-onset pre-eclampsia: STEPS (Study of Early Pre-eclampsia in Spain). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(3):373–82.
98. Gallo DM, Wright D, Casanova C, Campanero M, Nicolaides KH. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 19-24 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 May 1;214(5):619.e1-619.e17.

99. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, et al. Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: Implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(3):241–6.
100. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation.* 2012 Feb 21;125(7):911–9.
101. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(1):58.e1-58.e588.
102. von Dadelszen P, Payne B, Li J, Ansermino JM, Pipkin FB, Côté AM, et al. Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: Development and validation of the fullPIERS model. *Lancet.* 2011;377(9761):219-227.
103. Thangaratinam S, Allotey J, Marlin N, Dodds J, Cheong-See F, von Dadelszen P, et al. Prediction of complications in early-onset pre-eclampsia (PREP): development and external multinational validation of prognostic models. *BMC Med.* 2017;15(1):68.
104. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2004 Dec;104(6):1367–91.
105. Saleh L, Vergouwe Y, van den Meiracker AH, Verdonk K, Russcher H, Bremer HA, et al. Angiogenic Markers Predict Pregnancy Complications and Prolongation in Preeclampsia: Continuous Versus Cutoff Values. *Hypertension.* 2017;70(5):1025-1033.
106. Chappell LC, Duckworth S, Seed PT, Griffin M, Myers J, Mackillop L, et al. Diagnostic Accuracy of Placental Growth Factor in Women With Suspected Preeclampsia. *Circulation.* 2013;128(19):2121-2131.
107. Verlohren S, Perschel FH, Thilaganathan B, Dröge LA, Henrich W, Busjahn A, et al. Angiogenic Markers and Cardiovascular Indices in the Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension.* 2017;69(6):1192–7.
108. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63(2):346–52.
109. Engl S, Mayer RB, le Renard PE, Shebl O, Arzt W, Oppelt P. Retrospective evaluation of established cut-off values for the sFlt-1/PIGF ratio for predicting imminent delivery in preeclampsia patients. *Pregnancy Hypertension.* 2020;19:143–9.
110. Peguero A, Fernandez-Blanco L, Mazarico E, Benitez L, Gonzalez A, Youssef L, et al. Added prognostic value of longitudinal changes of angiogenic factors in early-onset severe preeclampsia: a prospective cohort study. *BJOG* 2020; <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16383>. 00: 1– 8.
111. Cuckle H. Rational and irrational ratios. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* 2016;48(3):275–8.
112. Verlohren S, Stepan H. Re: Rational and irrational ratios. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;49(9):157–160.
113. Wieczorek SJ, Wu AHB, Christenson R, Krishnaswamy P, Gottlieb S, Rosano T, et al. A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: A multicenter evaluation. *Am Heart J.* 2002;144(5):834-839.
114. Afshani N, Moustaqim-Barrette A, Biccard BM, Rodseth RN, Dyer RA. Utility of B-type natriuretic peptides in preeclampsia: A systematic review. *Int J Obstet Anesth.* 2013;22(2):96-103.

115. Kale A, Kale E, Yalinkaya A, Akdeniz N, Canoruç N. The comparison of amino-terminal probrain natriuretic peptide levels in preeclampsia and normotensive pregnancy *J Perinat Med*. 2005;33(2):121-124.
116. Resnik JL, Hong C, Resnik R, Kazanegra R, Beede J, Bhalla V, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2):450-454.
117. Johns MC, Stephenson C. Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Testing in Neonatal and Pediatric Patients. *Am J Cardiol*. 2008;101(3A):76-81.
118. Crispi F, Comas M, Hernández-Andrade E, Eixarch E, Gómez O, Figueras F, et al. Does pre-eclampsia influence fetal cardiovascular function in early-onset intrauterine growth restriction?. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009;34(6):660-665.
119. Iacovidou N, Briana DD, Boutsikou M, Gourgiotis D, Baka S, Vraila V-M, et al. Perinatal changes of circulating N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in normal and intrauterine-growth-restricted pregnancies. *Hypertens Pregnancy*. 2007;26(4):463–71.
120. Crispi F, Miranda J, Gratacós E. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(2S):S869-S879.
121. di Pasquo E, Ghi T, Dall’Asta A, Angeli L, Fieni S, Pedrazzi G, et al. Maternal cardiac parameters can help in differentiating the clinical profile of preeclampsia and in predicting progression from mild to severe forms. *Am J Obstet Gynecol*. 2019;221(6):633.e1-633.e9.
122. Schneuer FJ, Nassar N, Khambalia AZ, Tasevski V, Ashton AW, Morris JM, et al. First trimester screening of maternal placental protein 13 for predicting preeclampsia and small for gestational age : In-house study and systematic review. *Placenta*. 2012;33(9):735–40.
123. Yu L, Zhou Q, Peng Q, Yang Z. Left ventricular function of patients with pregnancy-induced hypertension evaluated using velocity vector imaging echocardiography and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Echocardiography*. 2018;35(4):459-466.
124. Ker JA, Soma-Pillay P. NT-proBNP: When is it useful in Obstetric Medicine?. *Obstet Med*. 2018;11(1):3-5.
125. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2015;37(2):81-92.
126. Porcelli BA, Diveley E, Meyenburg K, et al. A new definition of gestational hypertension? New-onset blood pressures of 130 to 139/80 to 89 mm Hg after 20 weeks of gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(3):442.e1-442.e7.
127. Martinez-Portilla RJ, Poon LC, Benitez-Quintanilla L, Sotiriadis A, Lopez M, Lip-Sosa DL, et al. Incidence of pre-eclampsia and other perinatal complications among women with congenital heart diseases: systematic review and meta-analysis. [published online ahead of print, 2020 Aug 8]. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020;10.1002/uog.22174.
128. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: Current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(8):466-480.
129. Benzing T. Hypertension: Testing for pre-eclampsia: paving the way to early diagnosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(4):200-202.
130. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:147-158.

## 7. Anejos

### 7.1. Consentimiento informado



## BIOQUÍMICA CLÍNICA

Área Gestión Clínica Laboratorio de Medicina

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACION ALTRUISTA DE MUESTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

#### INFORMACIÓN:

Normalmente, las muestras tomadas con fines diagnósticos o de exámenes rutinarios de salud, son desechadas por el laboratorio una vez se han informado los resultados solicitados por el médico responsable. Sin embargo, el establecimiento de valores de referencia poblacionales, así como la evaluación de nuevos marcadores diagnósticos o el estudio de valores de corte específicos, para mejorar la utilidad diagnóstica de las pruebas de laboratorio, en numerosas ocasiones están supeditados a la disponibilidad de muestras de diferentes fluidos biológicos (sangre periférica, orina, líquido cefalorraquídeo, pleural, ascítico o sangre de cordón umbilical) tanto de sujetos sanos como de pacientes.

Por tanto, la donación altruista de muestras de fluidos biológicos, orientada a la mejora de los procesos y aseguramiento de la calidad de las pruebas del laboratorio, supondría una aportación de extraordinario interés para la seguridad del paciente.

En la mayoría de los casos, sería suficiente con conservar en condiciones adecuadas, una alícuota de las muestras tomadas como parte del propio trabajo asistencial de los laboratorios de modo que, no se requiere ninguna intervención adicional sobre el paciente.

Las muestras tomadas sólo se conservarán y utilizarán para los fines expuestos en este documento de consentimiento, y en todo momento la información referente a usted será tratada de forma confidencial y codificada de manera que quede preservada su identidad (o la de la persona a la que representa).

#### DECLARO QUE:

He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Entiendo que la donación es altruista y que no derivará ninguna compensación.

- He sido informado/a de que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.
- He sido informado por el médico Dr. ....

*En consecuencia, doy mi consentimiento para la conservación de muestras de fluidos biológicos en las condiciones y fines aquí expuestos.*

*En.....a.....de.....de.....*

*Firma del profesional sanitario que informa*

*Firma del donante*

*Fdo.: D/Dña.....*

*Fdo.: D/Dña.....*

*En caso de menores o pacientes incapacitados temporal o permanentemente, el familiar o persona autorizada que representa al paciente*

*D/Dña.....*

*Parentesco:.....*

*DNI:.....*

*Firma en representación del donante*

#### **REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO**

*Este consentimiento puede ser revocado en cualquier momento a petición del donante o su representante autorizado.*

*Con fecha ....., revoco el consentimiento prestado para la donación altruista de muestras de fluidos biológicos.*

*Firma del profesional sanitario que informa*

*Firma del donante*

*Fdo.: D/Dña.....*

*Fdo.: D/Dña.....*

### **Nota informativa sobre el estudio Preeclampsia:**

La preeclampsia es uno de los trastornos hipertensivos del embarazo con mayor número de complicaciones (entre el 3 y el 10% de las gestaciones). Se define por la aparición de HTA y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación, y dependiendo de los casos pueden aparecer síntomas como dolor epigástrico, edemas, mareos, alteraciones visuales o dolor de cabeza.

La fisiopatología no está aún completamente dilucidada, aunque se sabe que alteraciones en la placentación, el estrés oxidativo, factores inmunológicos y genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

En los últimos años se han propuesto varios marcadores bioquímicos, placentarios y ecográficos que tratan de ayudar a predecir la enfermedad.

El establecimiento de valores de referencia poblacionales, la evaluación de nuevos marcadores diagnósticos o el estudio de valores de corte específicos mejoran la utilidad diagnóstica de las pruebas de laboratorio.

Las muestras recogidas se conservarán y utilizarán, en el caso de ser necesario, para medir parámetros bioquímicos como algunos elementos traza, el Calcio o el NT – proBNP (valoración de la disfunción ventricular), los cuales se están estudiando como posibles complementos que pueden ayudar en la prevención y diagnóstico de la enfermedad.

## 7.2. Dictamen del comité ética



SERVICIO DE SALUD  
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias  
Avd. De Roma s/n  
33011 Oviedo  
Tfno: 985107927/985108028  
e-mail: celcr\_asturias@hca.es

Oviedo, 29 de Junio de 2018

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto de Investigación n.º 175/18 titulado: "IDENTIFICACION Y DESARROLLO DE MARCADORES PREDICTORES DE NECESIDAD DE FINALIZACION DE LA GESTACION POR PREECLAMPSIA EN UNA SEMANA. Código de protocolo RISKPE1W. Investigador Principal, Dr. Enric Sabriá, Hospital San Camil ( Barcelona ).

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Se acepta la exención del Consentimiento Informado.

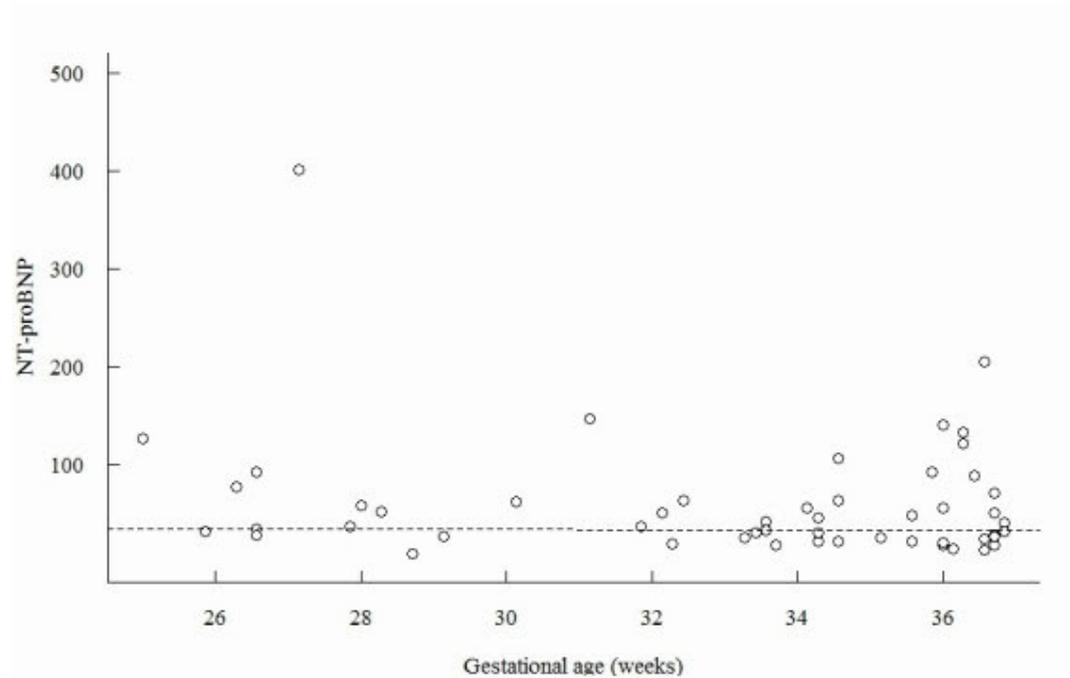
Le recuerdo que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.

Fdo: Mauricio Telenti Asensio  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias

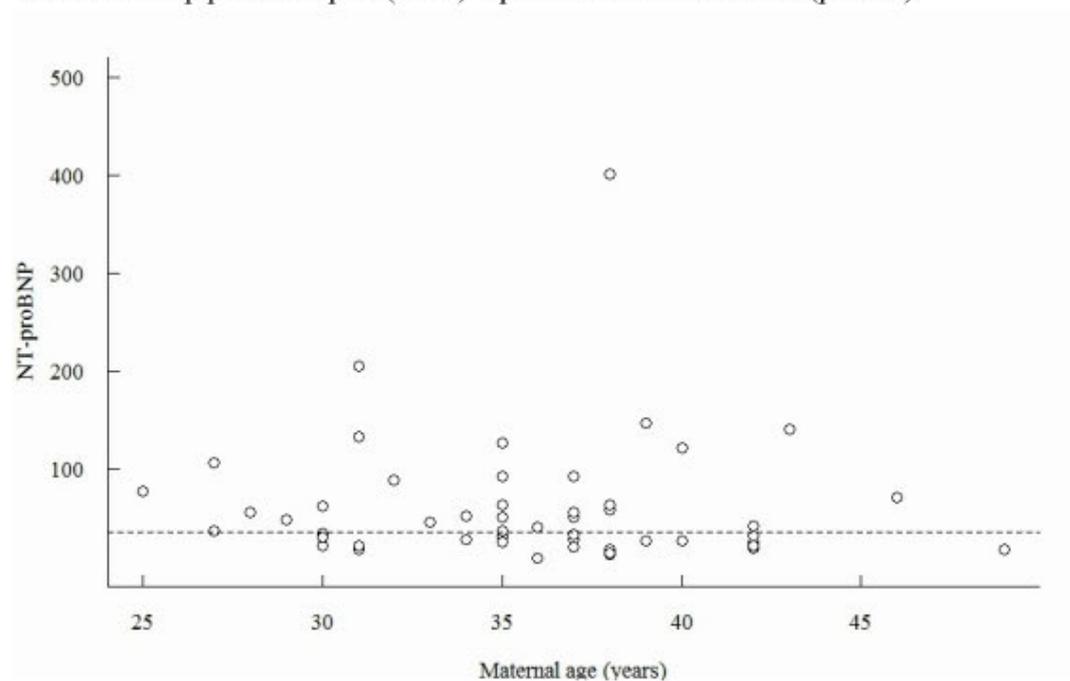


### 7.3. Material suplementario del artículo 2

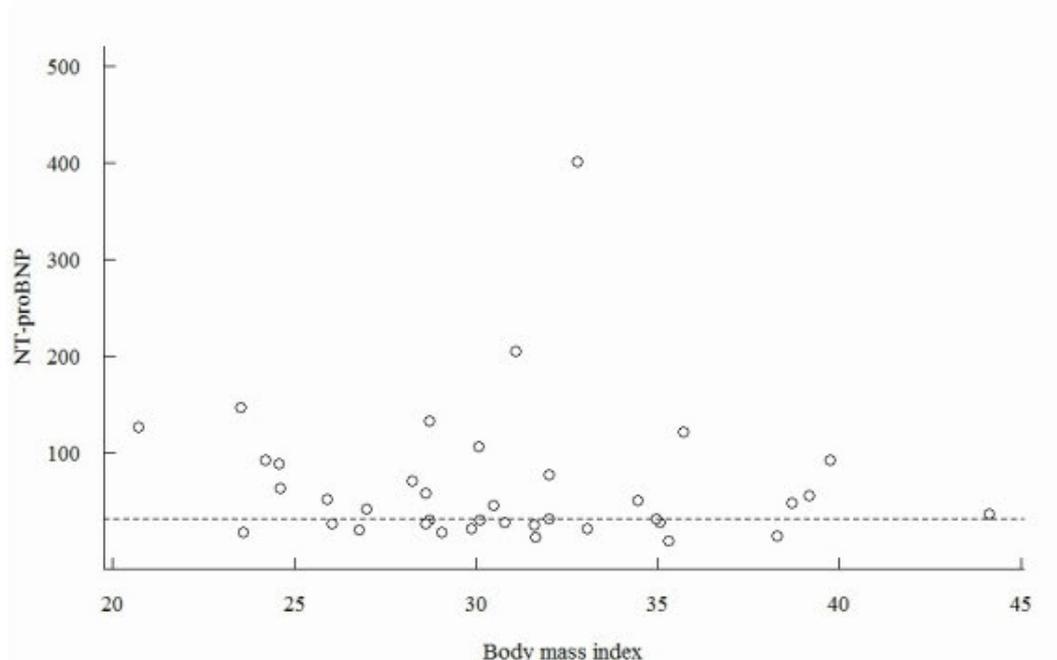
## Supplementary material



**Figure S1** Scatterplot with regression line (----) for relationship of N-terminal pro-B type natriuretic peptide and gestational age at inclusion, considering pregnancies that did not develop pre-eclampsia (n=52). Spearman's Rho of -0.135 (p=0.35).



**Figure S2** Scatterplot with regression line for relationship of N-terminal pro-B type natriuretic peptide and maternal age at inclusion, considering pregnancies that did not develop pre-eclampsia (n=52). Spearman's Rho of -0.163 (p=0.253).



**Figure S3** Scatterplots with regression lines for relationship of N-terminal pro-B type natriuretic peptide and body mass index, considering first determination of pregnancies that did not develop pre-eclampsia (n=52). Spearman's Rho of -0.144 (p =0.388).

**Table S1** Evaluation of influence of dichotomic factors on N-terminal pro-B type natriuretic peptide concentration in pregnancies without pre-eclampsia (n=52). Only first measurement of each patient is considered.

<i>Dichotomic factor</i>	<i>Factor present</i>	<i>Factor absent</i>	<i>P</i>
<b>Gestational diabetes</b> <sup>†</sup>	43 (22-63)	42 (27-74)	0.98
Chronic hypertension	30.5 (28-33)	42 (25-71)	0.51
Nulliparous	44 (27-67)	36 (22-77)	0.90
Pre-eclampsia in previous pregnancy	63 (40-101.5)	41 (27-71)	0.66
In vitro fertilisation	27 (19-46)	45 (27.5-74)	0.30
Intrauterine growth restriction	55 (32.5-117)	76 (37.5-199.5)	0.18
<b>BMI ≥ 30 (kg/m<sup>2</sup>)</b>	36 (28-73)	52 (27-89)	0.74
<b>Maternal age &gt;40 years</b> <sup>‡</sup>	29.5 (23.5-56.5)	49.5 (28-92)	0.46

Data are given as median (interquartile range). <sup>†</sup>There were only two pregnancies with pre-existing diabetes (they were considered gestational diabetes). <sup>‡</sup>Maternal age was assessed at time of sampling. BMI, body mass index.

## 7.4. Material suplementario del artículo 3

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Table S1:** Demographic and clinical characteristics of the study sample (363 women).

Comparison is made between pregnancies with early-onset preeclampsia leading to delivery within one week from last measurement (outcome present) and pregnancies that did not (outcome absent). Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney U test for quantitative variables and Pearson's chi-squared test for proportions, respectively.

<b>Characteristic</b>	<b>Outcome present (n= 47)</b>	<b>Outcome absent (n= 316)</b>	<b>Significant difference (p&lt; 0.05)</b>
Number of measurements	1 (1-2)	1 (1-2)	No
Age (years)	34 (29-38)	34 (30-38)	No
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.7 (27.7-30.8)	29,7 (26,2 – 34,3)	No
Pre-existing diabetes, n (%)	1 (2.1%)	18 (5,7%)	No
Nulliparity, n (%)	40 (85.1%)	194 (61,4%)	Yes
In vitro fertilization, n (%)	3 (6.4%)	26(8,2%)	No
PE in previous pregnancy, n (%)	1 (2.1%)	28 (8,9%)	No
Chronic hypertension, n (%)	6 (12.8%)	24 (7,6%)	No
Intrauterine growth restriction, n (%)	15 (31.9%)	63 (19,9%)	No
Platelets (10 <sup>3</sup> /μl)	201 (178-214)	239 (200 – 283)	Yes
Data at delivery			
GA (weeks)	32.0 (30.8-31.9)	38.4 (37.0-39.9)	Yes
Hypertension, n (%)	31 (66,0%)	59 (18,7%)	Yes
Proteinuria, n (%)	39 (83.0%)	23 (7,3%)	Yes
Reason for suspected preeclampsia <sup>§</sup>			

New-onset hypertension, n (%)	33 (70.2%)	152 (48.1%)	Yes
Worsening of chronic hypertension, n (%)	4 (8.5%)	5 (1.6%)	Yes
New-onset proteinuria, n (%)	33 (68.1%)	53 (16.8%)	Yes
Intrauterine growth restriction, n (%)	14 (29.8%)	42 (13.3%)	Yes
Symptoms <sup>¶</sup> , n (%)	3 (6.4%)	42 (13.3%)	No
Abnormal uterine perfusion, n (%)	9 (19.1%)	113 (35.8%)	Yes

Data are given as median (interquartile range) or %. §: There may have been more than one reason for suspected preeclampsia. ¶: The majority of symptoms were feet edema. GA, gestational age; BP, blood pressure.

**Table S2:** Marker median values at each gestational week and their formulae. The calculation excludes pregnancies that developed preeclampsia or intrauterine growth restriction. Repeated samples in each gestational age group have also been excluded.

Variable	Gestational weeks + days				Formula	r <sup>2</sup> (adjustment)
	28+0	30+0	32+0	33+4		
<b>sFlt-1 (pg/mL)</b>	1421.5	1633	1886	2362	$F(X) = 21122.3650 - 203.8084X + 0.5275X^2$	0.986
<b>PlGF (pg/mL)</b>	369.55	326.80	311.90	212.50	$F(X) = -3634.0547 + 40.4397X - 0.1023X^2$	0.912
<b>sFlt-1/PlGF ratio</b>	4	4	6	12	$F(X) = \text{Exp}(55.1863 - 0.5273X + 0.0013X^2)$	0.999
<b>Samples</b>	60	71	80	63		

sFlt-1, soluble FMS-like tyrosine kinase-1; PlGF, placental growth factor; X, gestational age in days.

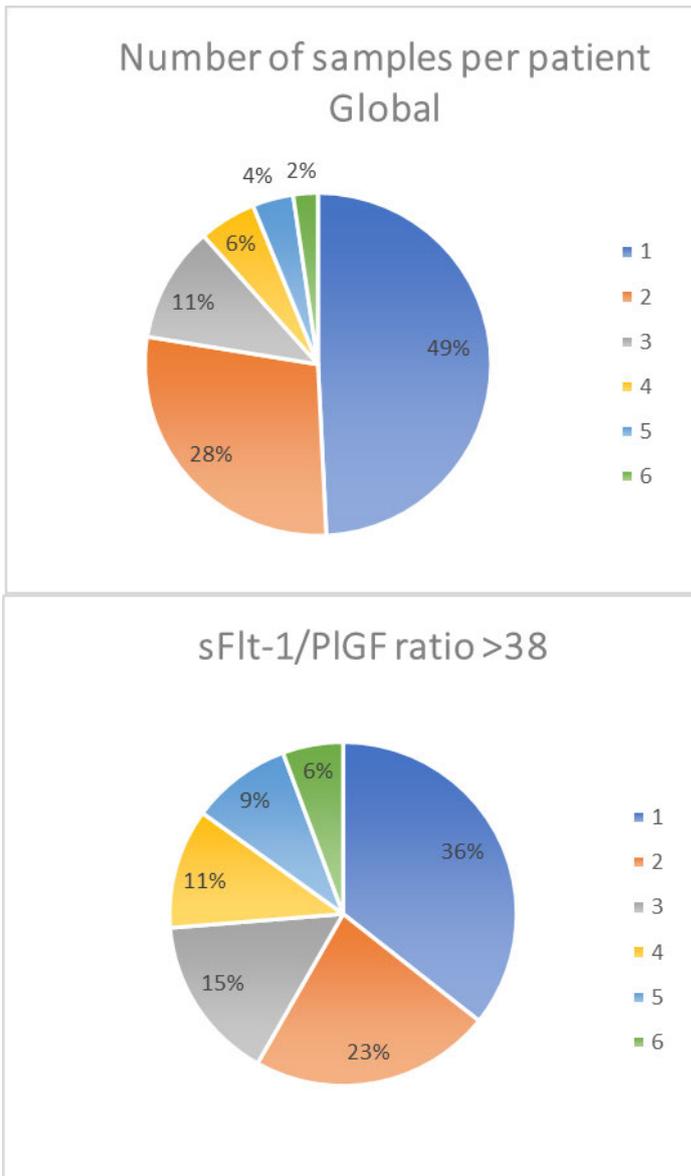
**Table S3:** Selected model description. Fixed effects coefficients of the selected linear mixed model built from 213 observations from 123 pregnancies with probit link function. As fixed effects, we entered gestational age at determination (GA), log transformed values of NT-proBNP and sFlt-1 MoM (without interaction terms) into the

model. As random effects, we had intercepts for each pregnancy. The random effect variance between pregnancies was 0.3. Akaike information criterion was 153.1. From the  $y$  value provided by the model, the posterior risk ( $\pi$ ) for delivery with early-onset preeclampsia within one week is given by the formula  $\pi = \Phi(y)$ , where  $\Phi$  is the cumulative distribution function of the standard normal distribution. Visual inspection of residual plots did not reveal any obvious deviations from homoscedasticity or normality.

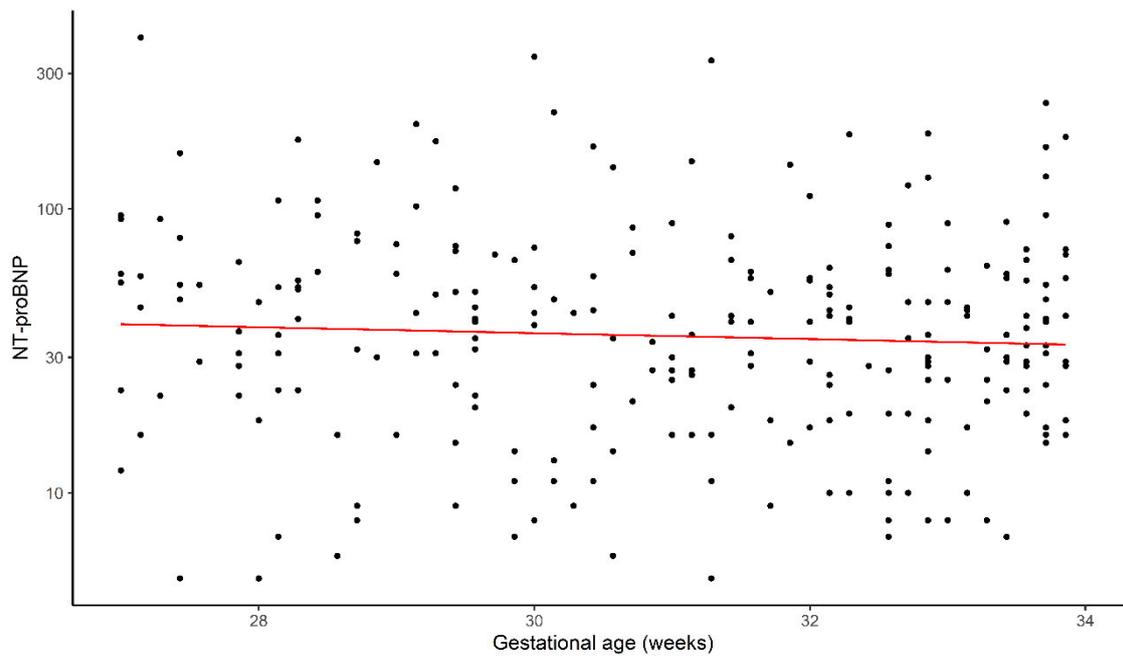
<b>Predictors</b>	<b>Estimate</b>	<b>Standard error</b>	<b>p-value</b>
<b>intercept</b>	-6.7278	1.6344	< 0.001
<b>gestational age (GA)</b>	0.2211	0.0948	0.020
<b>log (NT-proBNP)</b>	0.6611	0.1844	< 0.001
<b>log (sFlt-1 MoM)</b>	1.0039	0.3750	0.007

#### **FIGURE LEGENDS**

**Figure S1:** Distribution of number of samples per patient.



**Figure S2:** Distribution of NT-proBNP against gestational age at determination in 250 pregnancies that did not develop preeclampsia. Pearson correlation of -0.092 ( $p=0.149$ ).



**Figure S3:** Receiver operating characteristics (ROC) curve for median risk predictions of early-onset preeclampsia leading to delivery within one week in the subcohort with an sFlt-1/PIGF ratio above 38 and intrauterine growth restriction (93 samples, 14 of which developed the assessed outcome) in the left panel and with chronic hypertension (20 samples, 4 of which developed the assessed outcome) in the right panel, using a linear mixed model combined with gestational age (GA). No significant differences between AUC estimates of the sFlt-1 MoM model with NT-proBNP (solid line) and without NT-proBNP (dashed line) were observed in intrauterine growth restriction affected pregnancies ( $p=0.2$ ), neither in pregnancies with chronic hypertension ( $p= 0.361$ ).

