

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA**



**DIAGNOSTICO DE PREECLAMPSIA BASADO EN  
BIOMARCADORES ANGIOGENICOS PLACENTARIOS  
PRESENTES EN EL FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR**

**DANIELA ALBERS BUSQUETS**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN BIOESTADISTICA**

**Director de Tesis: Gabriel Cavada Ch.  
Copatrocinante: Dra. Alejandra Chaparro**

**Santiago, Abril 2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
MAGISTER EN BIOESTADISTICA**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster en Bioestadística presentada por la candidata

**DANIELA ALBERS BUSQUETS**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **MAGISTER EN BIOESTADISTICA** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día **13 de Abril del 2017**

**Gabriel Cavada Ch.**  
Director de Tesis  
Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

Sr. Mauricio Fuentes A.

Prof. Dr. Mauricio Canals L.

Dr. Sergio Alvarado O.  
Presidente Comisión de Examen



Universidad de los Andes  
Santiago-Chile

*Santiago de Chile, 19 de Mayo de 2014*

*Señores  
Concurso CORFO L1  
Presente*

*Estimados Señores:*

*El Comité de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes ha revisado el Proyecto titulado “**Diseño de un kit diagnóstico de preeclampsia basado en la detección temprana de exosomas y mediadores inflamatorios presentes en fluidos orales de embarazadas**” del que es investigador responsable la Dra. Alejandra Chaparro y que es presentado al Concurso CORFO L1: Perfil de I+D aplicada 2014.*

*Este estudio busca explorar la presencia temprana de exosomas placentarios asociados a preeclampsia (PE) en la saliva y fluido crevicular en pacientes embarazadas con periodontitis crónica, en una primera etapa, en miras de poder desarrollar un kit predictor de PE a nivel de fluidos orales.*

*Se trata de un estudio bien diseñado con una metodología consistente con los objetivos planteados. El tamaño muestral a estudiar está justificado. El laboratorio donde se realizará este proyecto tiene experiencia con este modelo experimental y el investigador principal ha realizado proyectos previos relacionados que avalan su competencia.*

*El consentimiento informado es adecuado y se especifican los objetivos del estudio, la confidencialidad del manejo de la información. Además se indica la manera de ubicar al investigador responsable en caso de ser necesario.*

*Tomando en cuenta lo anteriormente enunciado, el Comité de Ética no presenta reparos en la realización de este proyecto.*

*Sin otro particular, saludan atentamente*

*A. Serani Merlo* *Colomba Cofré*

*Dr. Alejandro Serani Merlo  
Presidente*

*Dra. Colomba Cofré Dougnac  
Secretaria Académica*



**Dedicatoria:**

*A mi marido Axel y a mis niños: Max, Lucas y Filippa.*

*A mi madre y padre*

*A Mateo que perdiste tu vida por esta enfermedad*

### **Agradecimientos:**

Agradezco al Profesor Gabriel Cavada, por su incondicional entrega, ayuda y confianza durante los años de estudio y desarrollo de la Tesis. A la Dra. Alejandra Chaparro y Dr. Benjamín Martínez por creer en mí y apoyarme durante todos estos años de estudio.

A mi padre y madre, sin Uds. este logro no hubiese sido posible. A Tania Cases por haber impulsado mi decisión a enriquecer mi carrera profesional.

Y por último a mi marido, Axel, por tu paciencia en cuidar a los niños durante mis noches y fines de semanas de estudio.

## RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una enfermedad de causa desconocida, multifactorial y multiorgánica del embarazo. Los exosomas, considerados biomarcadores, pueden ser aislados del fluido gingival crevicular (FGC), y son capaces de indicar tanto procesos biológicos fisiológicos como patológicos. En este contexto, la investigación pretende determinar la existencia de biomarcadores angiogénicos placentarios presentes en el Fluido Gingival Crevicular para el diagnóstico de PE. Para ello se tomaron muestras de FGC a 181 mujeres embarazadas, entre las semanas 22 y 33 de gestación (171 sanas y 10 con diagnóstico de PE), para la detección de 4 biomarcadores: fosfatasa alcalina de placenta (PLAP), marcador específico de exosomas, glicoproteína 53 (CD63), factor de crecimiento placentario (PIGF) y tirosina cinasa-1 símil-fms soluble (SFLT-1). Se realizó análisis de regresión logística para cada biomarcador y posterior estimación de la curva ROC. Para la estimación en conjunto de los biomarcadores, se realizó análisis de componentes principales, regresión logística y estimación de la curva ROC. Los resultados mostraron mayor cantidad de CD63, concentraciones de SFLT-1 y PLAP en mujeres con PE. PIGF se encontró aumentado en mujeres sanas. El área bajo la curva ROC en la estimación individual fue de: 0.5997 para PIGF, 0.7784 para SFLT-1, 0.7956 para CD63 y de 0.9252 para PLAP. La utilización de 2 componentes principales en la estimación conjunta logró explicar el 85% de la varianza y la estimación del área bajo la curva ROC conjunta fue de 0.9918. Se puede concluir que los biomarcadores detectados en el FGC, en este estudio en *Fase Exploratoria*, son una buena herramienta para discriminar las pacientes sanas versus con PE.

# ÍNDICE

|           |                                                                                              |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....                                                        | <b>1</b>  |
| <b>2</b>  | <b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....                                                      | <b>3</b>  |
| <b>3</b>  | <b>CAPÍTULO III: OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS</b> .....                                   | <b>7</b>  |
| <b>4</b>  | <b>CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS</b> .....                                                          | <b>7</b>  |
| <b>5</b>  | <b>CAPÍTULO V: METODOLOGIA</b> .....                                                         | <b>8</b>  |
| 5.1       | <b>METODOLOGIA ESTADÍSTICA:</b> .....                                                        | <b>8</b>  |
| 5.2       | <b>METODOLOGÍA DEL ESTUDIO</b> .....                                                         | <b>22</b> |
| 5.2.1     | DISEÑO DEL ESTUDIO: .....                                                                    | 22        |
| 5.2.2     | UNIVERSO Y MUESTRA: .....                                                                    | 22        |
| 5.2.3     | VARIABLES O TÓPICOS DE ESTUDIO .....                                                         | 27        |
| 5.2.4     | ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL TRABAJO EN TERRENO: .....                                        | 27        |
| 5.2.5     | MÉTODOS O PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA<br>INFORMACIÓN E INSTRUMENTOS UTILIZADOS:..... | 27        |
| 5.2.6     | TÉCNICA DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN:.....                                             | 28        |
| 5.2.7     | ASPECTOS ÉTICOS: .....                                                                       | 28        |
| 5.2.8     | FINANCIAMIENTO: .....                                                                        | 28        |
| <b>6</b>  | <b>CAPÍTULO VI: RESULTADOS</b> .....                                                         | <b>29</b> |
| 6.1       | <b>ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y REDUCCIÓN DE VARIABLES</b> .....                                   | <b>29</b> |
| 6.2       | <b>REGRESIÓN LOGISTA, CURVA ROC</b> .....                                                    | <b>33</b> |
| <b>7</b>  | <b>CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN O COMENTARIOS</b> .....                                           | <b>39</b> |
| <b>8</b>  | <b>CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES</b> .....                                                     | <b>42</b> |
| <b>9</b>  | <b>CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA</b> .....                                                       | <b>43</b> |
| <b>10</b> | <b>CAPÍTULO X: ANEXOS</b> .....                                                              | <b>47</b> |
| 10.1      | Tablas anexas .....                                                                          | 47        |
| 10.2      | Consentimiento Informado para Pacientes .....                                                | 51        |
| 10.3      | Carta de Colaboración .....                                                                  | 58        |



## **1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

La preeclampsia (PE) es una enfermedad de causa desconocida, multifactorial y multiorgánica del embarazo (1,2). Se presenta comúnmente en el tercer trimestre del embarazo con una incidencia entre un 3% a un 7%, dependiendo de la muestra de los estudios (3). En Chile el 25% de las muertes maternas ocurridas entre los años 2000 y 2004 estuvo relacionado con el síndrome hipertensivo del embarazo, ubicándose ésta dentro de las primeras 5 causas de muerte para ese período (4). Comúnmente se asocia con una falla por parte de los trofoblastos para invadir las arterias espirales, lo que conlleva a un aumento en la resistencia vascular de la arteria uterina, produciendo finalmente un descenso en la perfusión placentaria (5). El diagnóstico de PE es realizado basándose en la presencia de dos lecturas de ya sea presión sistólica o diastólica elevada, separadas de 4 a 6 horas, y proteinuria (1). Además de estas herramientas se utiliza el examen imagenológico de un Doppler ya que en éste se observa el flujo restringido de la arteria uterina (1). Si bien estos elementos permiten identificar la PE en las embarazadas es fundamental poder predecirla para así poder prevenir sus consecuencias, tanto en mortalidad como en morbilidad y realizar un adecuado manejo (1,5)

Durante el embarazo la placenta tiene un rol fundamental en la adaptación del organismo. Ella es la encargada de la producción y liberación de mediadores endocrinos, vesículas extracelulares, micro-vesículas y exosomas, los que podrán modificar la fisiología materna y desarrollo fetal (6). Estos exosomas son vesículas secretadas por exocitosis y reflejan los estados fisiológicos y funcionales de las células que las originan (incluyendo la placenta humana) (6). Los exosomas son considerados biomarcadores ya que estos son estructuras objetivamente cuantificables que pueden indicar tanto procesos biológicos fisiológicos como patológicos (7,8). Esta última característica, cobra real importancia ya que podrían ser utilizados como biomarcadores predictivos para la preeclampsia, debido a que son aislados

de fluidos corporales, como la saliva y el fluido gingival crevicular, los cuales podrían reflejar el estado general de salud del organismo. (9–11). En esta tesis, nos preguntamos, si existirán biomarcadores angiogénicos placentarios en el fluido gingival crevicular (FGC) capaces de diagnosticar la preeclampsia.

Para el diagnóstico de una enfermedad es fundamental realizar un análisis estadístico de sensibilidad y especificidad del test o elementos diagnósticos. De gran utilidad resulta para ello la utilización de la curva ROC (Receiver Operator Characteristic o Característica Operativa del Receptor). Capaz de ilustrar la relación entre la sensibilidad y la especificidad (12,13), y en particular en esta tesis, para la determinación de los biomarcadores a nivel del fluido gingival crevicular para el diagnóstico de la preeclampsia.

La estimación de la curva ROC se realizó posterior a la regresión logística, modelada mediante máxima verosimilitud. La utilidad de este estudio es poder idealmente detectar biomarcadores en FGC que nos permitan en un futuro desarrollar un kit diagnóstico de preeclampsia en etapas temprana del embarazo y así poder hacer el adecuado manejo de la situación.

## **2 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

La preeclampsia (PE) es una enfermedad de causa desconocida, multifactorial y multiorgánica que ocurre durante el embarazo (1,2). Su presentación es bien variada, pero se caracteriza por un cuadro clínico de hipertensión, edema y proteinuria (1,3,14). Hasta el momento, y a pesar de los recursos invertidos en su investigación y tratamiento, no se conoce completamente la etiopatogenia de la PE por lo que no existe un tratamiento que la revierta una vez iniciada (1,3,14). El único manejo real de la PE está enfocado a la prevención de la morbimortalidad materna y perinatal asociada a la PE, mediante un control prenatal a todas las embarazadas y la interrupción del embarazo cuando se diagnostica PE. Dada su frecuencia de ocurrencia y potencial severidad es esencial su diagnóstico temprano (1,3,14).

Si bien actualmente el diagnóstico de preeclampsia se basa en los exámenes clínicos y de laboratorio practicados a embarazadas enfocados principalmente en la detección de hipertensión y proteinuria (1), revisiones sistemáticas (14–17) han mostrado que la cuantificación de proteinuria, ácido ureico o transaminasas no tienen alta sensibilidad para predecir la enfermedad, reportando por ejemplo, para la detección mediante pruebas hepáticas una sensibilidad menor al 70% (16). Es de aquí donde los biomarcadores están jugando un rol fundamental ya no solo en la descripción de una enfermedad sino que también en la predicción temprana de éstas (14–17).

Los biomarcadores son características, sustancias, estructuras o procesos medibles objetivamente y evaluados como indicadores de normalidad de procesos biológicos, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas (7,8,10). La preeclampsia presenta marcadores propios del proceso patológico (14,17). Factores angiogénéticos, unidades fetoplacentarios, DNA y RNA fetal libre de células, marcadores biofísicos y exosomas, entre otros, están siendo estudiados como posibles biomarcadores

(14,18). En particular los exosomas, nanovesículas de 50-100 nm de diámetro con contenido que refleja fielmente su célula secretora, pueden ser detectadas fácilmente en la sangre, orina, plasma y líquido amniótico entre otros (11,18,19). Uno de los posibles lugares a encontrar biomarcadores y en especial los exosomas es en la saliva y el fluido gingival crevicular (FGC) (9–11).

El FGC corresponde a un transudado de los fluidos intersticiales de los tejidos gingivales producido por un gradiente osmótica (20). Contiene además una serie de sustancias derivadas de células inflamatorias, células del periodonto y bacterias orales. Se origina de los vasos sanguíneos de la encía y fluye a través de la membrana externa basal y del epitelio de unión para llegar así al surco gingival (21). Por su íntima relación entre la saliva y también la sangre es que se ha detectado la presencia de biomarcadores sistémicos en éste (9,21,20,22,23).

Uno de los objetivos de la presente investigación fue determinar si existen biomarcadores propios de la preeclampsia en el fluido gingival crevicular, que, de forma individual o conjunta, permitan el diagnóstico de ésta. Para ello debemos evaluar y analizar el proceso estadístico que ocurre para poder determinar la especificidad y sensibilidad de dichos biomarcadores, en el proceso de diagnóstico precoz de la preeclampsia.

Fosfatasa alcalina de placenta (PLAP), marcador específico de exosomas, glicoproteína 53 (CD63), factor de crecimiento placentario (PIGF) y tirosina cinasa-1 soluble SFLT-1, son biomarcadores que se han visto asociados en el desarrollo de preeclampsia, debido al cambio en sus concentraciones habituales durante el embarazo (6,24–28). Por ejemplo PIGF y SFLT-1 se han visto disminuidos (3,26). En esta tesis, estos serán los biomarcadores a estudiar.

Los clínicos por lo general dedican mucho tiempo en determinar diagnósticos de patologías presentes en sus pacientes y muchas veces logran hacer el diagnóstico de dichas patologías

utilizando diversos recursos tanto clínicos, de laboratorio como también literatura. De aquí nace la necesidad de desarrollar tests diagnósticos, simples de utilizar, que permitan una identificación certera y eficiente de las patologías es cada vez más necesaria. (29).

Carnero-Pardo (30) y Zhou con Obuchowski y McClish (31) proponen distintas fases en la validación de una prueba diagnóstica para lograr que ésta tenga una correcta seguridad y mínimos sesgos que puedan producirse en la elaboración de un test diagnóstico. La primera de ellas correspondería al *Estudio preliminar* o *Fase Exploratoria*, estudio inicial transversal o de caso-control con muestra de conveniencia. Su objetivo sería documentar la diferencia en los resultados de la prueba diagnóstica entre los sujetos con o sin la patología a diagnosticar y en donde serían excluidos los casos dudosos o complicados. En esta etapa se pretende definir si el Test Diagnóstico tiene alguna capacidad diagnóstica, comúnmente se realiza en un tiempo corto. La segunda etapa, *Estudio de validación retrospectiva* (30) o *Fase de Desafío* (31), tendría el mismo diseño que el Preliminar pero en este caso la muestra incluiría una representación adecuada del espectro del proceso a diagnosticar, incluyendo casos dudosos y de diversos estadios del proceso. Pudiendo así determinar la capacidad discriminativa del test, pero no la predictiva. Para las fases I y II es suficiente con demostrar la validación interna pero no la externa. La tercera fase propuesta es la del *Estudio de validación prospectiva* (30) o *Fase Clínica* (31), en ella la cohorte de sujetos de la muestra (representativa de una población bien definida) todavía no están diagnosticados. Pudiéndose evaluar la capacidad predictiva del test y demostrar su validez externa. Para ello es fundamental disminuir al máximo posible los sesgos, asegurando un mayor control de la evaluación independiente y ciega del test. Por último, Carnero-Pardo (30) propone una cuarta fase, de *Evaluación del impacto y utilidad*. En ella el test a validar se compara con la forma habitual de diagnóstico aplicado a sujetos en los que se plantea diagnosticar. La gran

diferencia radica en la aleatoriedad para la asignación de grupos y en que la evaluación de resultados se realiza en términos de salud.

### **3 CAPÍTULO III: OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

-Determinar la existencia de biomarcadores angiogénicos placentarios presentes en el Fluido Gingival Crevicular determinantes para el Diagnóstico de Preeclampsia.

#### **OBJETIVO ESPECÍFICOS:**

-Evaluar si para el diagnóstico de preeclampsia es necesario la existencia de un solo biomarcador presente en el FGC o si es necesario la utilización de múltiples biomarcadores de origen placentario.

-Estimar la curva ROC mediante la utilización del método de máxima verosimilitud para los biomarcadores encontrados el fluido gingival crevicular.

### **4 CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS**

Existen biomarcadores angiogénicos placentarios presentes en el fluido gingival crevicular capaces de diagnosticar preeclampsia.

## 5 CAPÍTULO V: METODOLOGIA

### 5.1 METODOLOGIA ESTADÍSTICA:

Según la clasificación que propone Carnero-Pardo (30) y Zhou con Obuchowski y McClish (31) este trabajo de investigación estaría en la primera fase correspondiente a un Estudio Preliminar.

El proceso de establecer diagnósticos es un proceso imperfecto que muchas veces se basa en probabilidades más que en la seguridad de estar en lo correcto (29). El Teorema de Bayes se utiliza comúnmente en los test diagnósticos o de “screening” ya que nos ayuda a evaluar las asociaciones de nuestras incógnitas mediante la utilización de probabilidades. Los test diagnósticos o de “screening” son pruebas realizadas en individuos que permitirían clasificarlos con respecto a su probabilidad de desarrollar una determinada enfermedad cuando todavía no presentan síntomas clínicos. Se utilizan ampliamente en el área de salud, sobre todo cuando la detección temprana de la enfermedad mejora de manera sustancial el pronóstico de los individuos (12). Una forma sencilla de relacionar los resultados del test diagnóstico con el “resultado verdadero” es teniendo como posibilidad que el test diagnóstico de positivo (presencia de enfermedad) o negativo (normal – ausencia de enfermedad) y la enfermedad (“resultado verdadero”) este presente o ausente. Así tendremos cuatro posibles interpretaciones de los resultados (cuadro 1). La primera de ella es la que el Test da positivo cuando la enfermedad está presente (verdadero positivo), una segunda opción es que el Test de negativo cuando hay ausencia de enfermedad (verdadero negativo). En ambos casos el Test Diagnóstico dio resultados verdaderos. Y las otras dos opciones restantes son resultados falsos del Test, es decir cuando el Test da positivo pero no hay enfermedad presente (falso positivo) o cuando el Test resulta negativo pero el “resultado verdadero” es presencia de enfermedad (Falso Negativo) (29).



La comparación del test diagnóstico con el “resultado verdadero” la gran mayoría de la veces se hace mediante la comparación con un “Gold Standard”, éste no es más que un indicador que permite identificar verdaderamente la enfermedad como presente o no, entregándonos la verdadera condición o estado del paciente (29,31). En el caso de la preeclampsia el “Gold Standard” actual que permite su identificación, una vez que ya hay síntomas y signos clínicos, es la hipertensión y proteinuria (1).

|      |                            | ENFERMEDAD                 |                           |
|------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|      |                            | Presente (D <sup>+</sup> ) | Ausente (D <sup>-</sup> ) |
| TEST | Positivo (T <sup>+</sup> ) | Verdadero Positivo         | Falso Positivo            |
|      | Negativo (T <sup>-</sup> ) | Falso Negativo             | Verdadero Negativo        |

*Cuadro 1*

Siempre es importante que en el desarrollo de un test diagnóstico las cuatro celdas del *cuadro 1* tengan valores ya que si no es imposible poder determinar los riesgos de mal clasificación y por ende saber la utilidad real del test. Esto nos permitirá finalmente establecer la seguridad que presenta el test diagnóstico, es decir la habilidad que tiene para diferenciar entre los distintos estados de salud del individuo. Así todo test diagnóstico tiene 3 características en común: una muestra de sujetos a los que se les evaluará, alguna forma de interpretación o graduación de los resultados del test diagnóstico y una referencia o “gold standard” la que utilizaremos para comparar los resultados obtenidos (29,31).

Lo que muchas veces ocurre en el desarrollo de pruebas diagnósticas es que éstas en un comienzo se ven muy promisoras y con cierto grado de seguridad pero con el paso del tiempo y dependiendo de las situaciones clínicas se empieza a notar ciertas falencias asociadas a posibles sesgos que ocurrieron, cómo por ejemplo: el método de validación elegido, es decir el “Gold Standard” no fue el adecuado, y se elige otro test que puede no diagnosticar de forma precisa y segura, o porque la selección de pacientes con y sin la enfermedad no fue la correcta, ocurriendo un error en quienes se les aplico la prueba diagnóstica o por una incorrecta selección de medida de evaluación de la seguridad del test diagnóstico (29,31).

#### **Sesgos en el “Gold-Standard”:**

El ***Sesgo por “Gold Standard” Imperfecto*** ocurre cuando el “Gold Standard” elegido no es el correcto y no diagnostica verdaderamente. Otro posible sesgo es que el test diagnóstico no es aplicado de forma independiente a cómo se determina el diagnóstico “verdadero” con el “Gold Standard”, conocido como ***Sesgo de Incorporación***. Esto quiere decir que se recoge la información para el desarrollo del test diagnóstico durante la evaluación con el “Gold Standard”. Esto puede producir una imparcialidad en la búsqueda de resultados ya que se va a intentar encontrar lo mismo en ambas metodologías, haciendo que se desista más rápido del diagnóstico con el test si el “Gold Standard” dio negativo o muy por el contrario incentivar el test diagnóstico positivo si el “Gold Standard” dio positivo. Otro sesgo presente en la determinación de la seguridad del test diagnóstico es cuando el “Gold Standard” es aplicado en otro momento que el test diagnóstico pudiendo verse afectados los resultados por la progresión de la enfermedad (***Sesgo de la Progresión de la Enfermedad***) o porque en ese lapsus de tiempo se le administro el tratamiento (***Sesgo Paradójico del Tratamiento***). El ***Sesgo por Verificación*** ocurre cuando solamente se somete a verificación

mediante “Gold Standard” a aquellos pacientes que dieron positivo en el test diagnóstico y por lo tanto el cálculo de la sensibilidad y especificidad se basa sólo en aquellos que recibieron el diagnóstico mediante el uso del “Gold Standard”. Esto muchas veces ocurre cuando el “Gold Standard” es una prueba de alto costo o de alta complejidad, para disminuir este tipo de error se debe autorizar el uso de diferentes pruebas como “Gold Standard” que permitan la corroboración del diagnóstico verdadero. (29,31).

### **Sesgo en la Muestra:**

La sensibilidad y la especificidad son características intrínsecas del test diagnóstico y por ende son independientes de la prevalencia de la enfermedad. Se ha establecido una variación de la sensibilidad y especificidad según el espectro de la enfermedad (su severidad y/o extensión), pacientes con distintos estadios de gravedad han mostrado prevalencias diferentes y esto llevaría a variaciones en los resultados de la sensibilidad y especificidad del test diagnóstico a evaluar. Así por ejemplo puede que un test sea más sensible para casos en que la patología sea más severa (ejemplo: tamaño grande de un pólipo) y los resultados del cálculo de sensibilidad se verían aumentados. Para aquellas fases de estudio de un test diagnóstico en la que no se incluyen todos los estadios de la enfermedad se podría estar cometiendo el **Sesgo de Espectro**. (29,31).

Por otra parte, podría ocurrir que los pacientes en los que se utilizó el test en primera instancia para describir sus propiedades difieran de aquellos pacientes en los que clínicamente se les va a aplicar el test. Así también podría ocurrir que los pacientes sin la enfermedad tengan otras patologías que lleven a falsos-positivos y por ende una disminución en la especificidad del test diagnóstico, en ambos casos estaríamos presente al **sesgo en la selección de la muestra**. Este sesgo se caracteriza porque la composición muestral es

influenciada por factores externos y por ende no es representativa de la población objetivo (29,31).

Por ello Zhou con Obuchowski y McClish (31) proponen la selección de la muestra según la fase del diseño del test diagnóstico en la que uno se encuentre. Para la *Fase Exploratoria* la población objetivo tiene identificada claramente quienes tienen y no la patología y la prevalencia de la condición no necesariamente es la misma en la muestra que en la población y los pacientes con la enfermedad representan los casos claramente identificados como tal ya que se busca que el test pueda realmente diferenciar a los más enfermos (casos) de los totalmente sanos (control). Como consecuencia de esto la estimación de la curva ROC, sensibilidad y especificidad están “sobrevaloradas” es decir sus resultados son más altos de lo que se esperaría encontrar en una población real, con esto la gran utilidad en esta fase es poder descartar aquellos test que no tienen alguna capacidad diagnóstica no siendo capaces de discriminar los extremos.

#### **Sesgo en la medida de evaluación de la seguridad del test diagnóstico:**

La selección del tipo de medida a utilizar para evaluar la seguridad del test depende principalmente de la fase en la que se encuentre el test diagnóstico, los objetivos del estudio y las aplicaciones clínicas que el clínico le pueda dar. Así por ejemplo un test que se encuentra en la *Fase Exploratoria* deberá utilizar la curva ROC como medida de evaluación ya que responde a la pregunta fundamental de esta etapa: ¿Puede el test diferenciar entre paciente con y sin una determinada condición? Y un test diagnóstico que este en Fase II o III debería considerar dentro de su medida de evaluación aquella que ajuste por co-variables (31).

Por ultimo en la determinación de la sensibilidad y especificidad juega un rol el azar. Ya que ambas son determinadas por observaciones, en la gran mayoría de los casos, en muestras

pequeñas. Debido al azar en cualquiera de las dos muestras (con o sin la enfermedad de interés) podemos obtener una mala interpretación de la sensibilidad y especificidad encontrada, incluso si éste no tiene los sesgos mencionados anteriormente. Por lo que se recomienda acompañar los resultados de sus respectivos intervalos de confianza. El rango de éstos nos determinará el grado de precisión de los valores obtenidos para la sensibilidad y la especificidad. En donde a rangos amplios menor será la precisión del test diagnóstico (29).

Basándonos en el *cuadro 1* y mediante la aplicación del Teorema de Bayes, estableciendo  $D^+$  como la presencia de enfermedad,  $D^-$  como ausencia de enfermedad (ambos eventos mutuamente excluyentes y exhaustivos),  $T^+$  test positivo y  $T^-$  test negativo, podemos definir: La *sensibilidad* como la probabilidad que el test sea positivo dado que el individuo testeado realmente tenga la enfermedad:

$$P(T^+|D^+) = \frac{P(T^+ \cap D^+)}{P(D^+)} = \frac{P(T^+)P(D^+|T^+)}{P(T^+)P(D^+|T^+) + P(T^-)P(D^+|T^-)}$$

*Ecuación 1 (12)*

Se buscará un test altamente sensible cuando la no detección de enfermedad sea un problema mayor y con consecuencias fatales. O también en aquellos casos en donde estemos en etapas tempranas de diagnóstico y necesitemos descartar posibles enfermedades, en dichos casos los test altamente sensibles nos ayudaran a descartar enfermedades cuando estos den negativo (29).

La *especificidad* como la probabilidad que sea test de negativo dado que el individuo testeado no tiene la enfermedad:

$$P(T^-|D^-) = \frac{P(T^- \cap D^-)}{P(D^-)} = \frac{P(T^-)P(D^-|T^-)}{P(T^-)P(D^-|T^-) + P(T^+)P(D^-|T^+)}$$

*Ecuación 2 (12)*

Un test con alta especificidad será útil cuando queramos confirmar un diagnóstico sugerido por otra fuente ya que da muy pocos resultados falsos-positivos. Así también serán de utilidad cuando se pueda producir, por ejemplo: daño físico, psicológico, emocional o financiero a pacientes con resultados falso-positivos. Por lo tanto son de gran utilidad cuando sus resultados dan positivo (29).

Cuando necesitamos decidir si es necesario indicar un test diagnóstico la sensibilidad y especificidad son propiedades a considerar pero el gran dilema que presenta el clínico es si el paciente presenta realmente la enfermedad una vez que tenemos el resultado del test diagnóstico y es aquí donde el Valor Predictivo, ya sea negativo o positivo, cobran gran importancia ya que nos entregan una probabilidad una vez obtenido el resultado del test (29). El *valor predictivo positivo* (VPP) corresponde a la probabilidad de desarrollar la enfermedad dado que el test dio positivo:

$$\text{VPP: } P(D^+ | T^+) = \frac{P(D^+ \cap T^+)}{P(T^+)} = \frac{P(D^+)P(T^+ | D^+)}{P(D^+)P(T^+ | D^+) + P(D^-)P(T^+ | D^-)}$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{sensibilidad} * \text{prevalencia}}{(\text{sensibilidad} * \text{prevalencia}) + (1 - \text{especificidad}) * (1 - \text{prevalencia})}$$

Ecuación 3 (12,29)

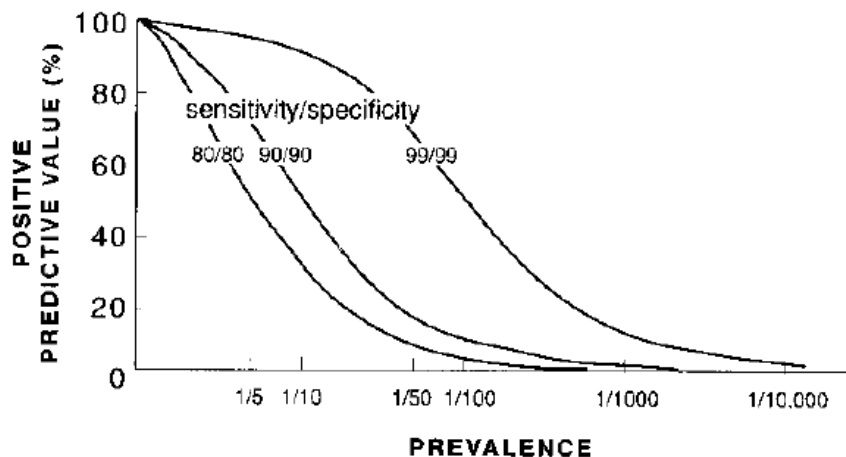
El *valor predictivo negativo* (VPN) corresponde a la probabilidad de no desarrollar la enfermedad dado que el test dio negativo:

$$\text{VPN: } P(D^- | T^-) = \frac{P(D^- \cap T^-)}{P(T^-)} = \frac{P(D^-)P(T^- | D^-)}{P(D^-)P(T^- | D^-) + P(D^+)P(T^- | D^+)}$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{especificidad} * (1 - \text{prevalencia})}{(\text{especificidad} * (1 - \text{prevalencia})) + (1 - \text{sensibilidad}) * \text{prevalencia}}$$

Ecuación 4 (12,31)

A mayor especificidad de un test diagnóstico el VPP será mayor y por el contrario a mayor sensibilidad mejor será el VPN, así también la prevalencia tiene un rol en los resultados del VPP y VPN ya que si la sensibilidad y especificidad es alta y la prevalencia también el test tendrá buen desempeño, pero a prevalencias bajas el VPP cae casi a cero y el test no cumple función en diagnosticar la enfermedad y mientras más baja sea la sensibilidad y especificidad mayor es el rol de la prevalencia en los valores obtenidos en el VPP y VPN, resultando así que la sensibilidad y especificidad son valores intrínsecos del test pero no así los valores predictivos (probabilidades) donde si habría una influencia clara de la prevalencia de la enfermedad (29,31).



*VPP según sensibilidad, especificidad y prevalencia de la enfermedad (29)*

Lo que muchas veces se busca con un test diagnóstico es que éste tenga alta sensibilidad y alta especificidad, pero esto es en la gran mayoría de los casos muy difícil de lograr. De ahí que la curva ROC (Receiver Operator Characteristic o Característica Operativa del Receptor) es capaz de ilustrar una relación entre la sensibilidad y la especificidad.

La curva ROC grafica la probabilidad de un resultado positivo verdadero (sensibilidad del test) contra la probabilidad de un resultado falso positivo (1 – especificidad) para una serie de puntos de corte. Es una curva monótona creciente acotada al cuadro formado por los

puntos (0,0) y (1,1). Mientras más cercana la curva a la esquina superior izquierda del gráfico, más preciso el test o marcador. Muy por el contrario, un marcador que no entregue información tiene una curva ROC diagonal con una línea de 45°, es decir tiene una curva ROC que coincide con la recta bisectora del primer cuadrante. Comúnmente la elección del punto más cercano a esta posición es el elegido como punto de corte, maximizando tanto la sensibilidad como la especificidad. Así la curva ROC es capaz de mostrar la capacidad discriminatoria de un marcador o test entre 2 grupos de sujetos, casos y controles (12,13,29,31), pudiéndose calcular el área bajo ésta sumando sucesivos trapecios (32), esta área nos proporcionará una idea general de la seguridad que presenta el test diagnóstico a evaluar (29,31).

Las características principales de la curva ROC son:

1. No hay dependencia de la unidad de medida del test o marcador.
2. Provee una escala común para realizar comparaciones con otros marcadores o test.
3. Muestra los posibles niveles de desempeño a lograr mediante la modificación o variación del punto de corte.

Para el caso de los marcadores y específicamente los biomarcadores, debemos suponer que  $D=0$  denota control,  $D=1$  denota casos y que altos valores de un biomarcador  $Y$  en los sujetos, son indicativos de pertenecer al grupo de casos. Así estableceremos que una curva ROC para un biomarcador  $Y$  es una representación gráfica del Valor Verdadero positivo,  $VVP = P(Y \geq c | D=1)$  versus el Valor Falso Positivo,  $VFP = P(Y \geq c | D=0)$ , con el criterio de punto de corte  $Y \geq c$  (donde  $c$  varía de  $-\infty$  a  $\infty$ )(13).

En este trabajo estimaremos la curva ROC post-estimación de un modelo logístico lineal, desarrollado mediante máxima verosimilitud.



El modelo logístico se utiliza cuando la variable respuesta es de tipo binaria. Éste modela la probabilidad de un resultado positivo dado un determinado número de predictores. Donde el resultado positivo o de interés se denota con el número 1 y la ausencia de resultado o resultado negativo (fracaso) se denota con el número 0, siendo así la variable respuesta de tipo dicotómica (33,34).

En forma general el modelo logístico lineal se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\pi(X) = P(Y = 1|X) = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p)}}$$

Ecuación 5

En donde  $Y$  es la variable de interés,  $X$  corresponde a un vector de variables independientes ( $X = X_1, X_2, X_3 \dots X_p$ ).  $\beta_0$  a  $\beta_p$  corresponde a los coeficientes de la regresión y  $X_1$  a  $X_p$  representan a variables independientes del modelo (35). Este mismo modelo lo podemos expresar en función a nuestra variable respuesta que es de tipo binaria (tipo de paciente: puede o no tener preeclampsia).

A modo de simplificar las ecuaciones futuras consideraremos:

$$A = \text{Evento de tener preeclampsia}; P(A) = p$$

Por lo tanto, el modelo logístico será:

$$P(A|X) = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p)}}$$

Ecuación 6

La función logística busca transformar la relación en forma de “s” que se observa comúnmente en los gráficos que muestran la relación entre una variable de exposición y una de respuesta, por una regresión de tipo lineal, donde sus límites ya no van de 0 a 1 sino que de  $-\infty$  a  $+\infty$ . La función logística está definida como el logaritmo natural de la ODDS de que

ocurra el evento de interés  $A$ . En donde  $p = E(Y|X)$ , y que se expresa de la siguiente manera:

$$\ln(ODDS(A)) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \ln(e^{a+\beta X})$$

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = a + \beta X$$

Ecuación 7 (12)

Cuando la variable respuesta es de tipo binaria se asume que su distribución es de tipo Bernoulli y la sumatoria de éstas distribuirá binomial. En donde la probabilidad de que mi evento de interés ( $p$ ) ocurra  $r$  veces, estará dado por:

$${}_n C_r p^r (1-p)^{n-r}$$

Ecuación 8 (34)

Donde  ${}_n C_r = \frac{n!}{r!(n-r)!}$  y corresponde a la forma en que  $r$  individuos pueden ser elegidos de la muestra tamaño  $n$ . Bajo este supuesto, esta probabilidad ( $p$ ) se conoce como verosimilitud (34). Así en el modelo logístico la estimación de los parámetros se podrá realizar mediante el mecanismo de máxima verosimilitud, el cual busca maximizar la función de verosimilitud o de probabilidad conjunta. En otras palabras, el método de máxima verosimilitud genera valores del parámetro desconocido que maximice la probabilidad de obtener los datos observados (maximizando la función de verosimilitud). Para lograr la máxima verosimilitud primero debemos construir la función de verosimilitud. Basándonos en la ecuación 6 expuesta anteriormente y considerando que  $Y$  puede ser codificado como 0 y 1, tendremos dos situaciones según si  $Y = 1$  o si  $Y = 0$ . En el primer caso en donde  $Y = 1$  dado un determinado  $X$  será denotado como  $\pi(X)$  y por lo tanto  $1 - \pi(X)$  corresponde a la probabilidad condicional cuando  $Y = 0$  para un determinado  $X$ ,  $\Pr(Y = 0|X)$ . Por lo tanto, para aquellos pares de datos  $(X_i, Y_i)$ , en donde  $Y_i = 1$ , contribuirá a la función de verosimilitud con

$\pi(X_i)$  y para aquellos pares de datos donde  $Y_i = 0$ , su contribución será de  $1 - \pi(X_i)$ . En base a esto una forma conveniente de expresar la contribución del par  $(X_i, Y_i)$  a la función de verosimilitud va a estar dada por  $\pi(X_i)^{Y_i} [1 - \pi(X_i)]^{1 - Y_i}$ . Como se asume que las observaciones son independientes, la función de verosimilitud finalmente se obtendrá mediante la multiplicación de la expresión anteriormente expuesta:

$$l(\beta) = \prod_{i=1}^n \pi(X_i)^{Y_i} [1 - \pi(X_i)]^{1 - Y_i}$$

Ecuación 9 (35)

La función de máxima verosimilitud por lo tanto establece que utilicemos como estimador  $\beta$  aquel que maximice la ecuación 9 (34,35) y está expresada en términos de logaritmo de la siguiente forma:

$$L(\beta) = \ln[l(\beta)] = \sum_{i=1}^n \{Y_i \ln[\pi(X_i)] + (1 - Y_i) \ln[1 - \pi(X_i)]\}$$

Ecuación 10 (35)

Considerando la altísima correlación entre los biomarcadores que participan del fenómeno de la preeclampsia, especialmente entre: tirosina cinasa-1 sÍmil-fms soluble (SFLT-1) y el factor de crecimiento placentario (PIGF), y entre fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y glicoproteína 53 (CD63) (5,6,27,36,28,37–40) es que proponemos solucionar esto mediante la utilización del método de componentes principales.

El método de componentes principales tiene por objeto reducir la dimensionalidad de un problema de múltiples variables, aplicando una sucesión de transformaciones lineales a las variables, de modo que un subconjunto de ellas concentre la mayor parte de la variabilidad contenida en las variables originales (41,42).

Peña (41) establece que “con variables de alta dependencia es frecuente que un pequeño número de nuevas variables (menos del 20% de las originales) expliquen la mayor parte (más del 80%) de la variabilidad original”. Es así como el análisis de componente principales nos permitirá: transformar las variables originales, que están correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando así la interpretación de los datos (41).

Si suponemos que tenemos una matriz  $\mathbf{X}$  de dimensionalidad  $n \times p$ , en donde tenemos dispuestos los valores de  $p$ -variables en  $n$  elementos de una población y previamente hemos restado a cada variable su media para que así la matriz  $\mathbf{X}$  tenga media cero, la matriz de covarianzas esté dada por  $\frac{1}{n} \mathbf{X}'\mathbf{X}$  y sus columnas contengan las variables y las filas los elementos. Nos encontramos frente al problema de cómo encontrar un espacio de dimensión menor pero que represente adecuadamente los datos. Según Peña (41) esto se puede abordar de 3 maneras, todas equivalentes:

- *Enfoque Descriptivo*: en donde el subespacio de dimensión menor que  $p$  a encontrar, debe permitir que al proyectar sobre él los puntos conserven sus estructuras con la menor distorsión posible.
- *Enfoque Geométrico*: implica considerar la proyección de los puntos en un diagrama de dispersión en donde se observa que éstos se sitúan con forma de elipse, pudiendo así dar su eje mayor. Este eje mayor corresponde a la recta que minimiza las distancias ortogonales. Si consideramos el eje mayor de una elipse como una nueva variable, estamos pasando de variables correlacionadas a variables ortogonales.
- *Enfoque Estadístico*: el que establece que, al representar, con un mínimo de pérdida de información, puntos  $p$  dimensionales en un espacio de dimensión 1 es equivalente a utilizar una nueva variable  $Z_1$  que sustituya las  $p$  variables originales. Así esta

nueva variable,  $Z_1$ , debe tener máxima correlación con las originales y por ende permitir prever las variables originales con la máxima precisión.

Así el primer componente principal estará formado por la combinación lineal de las variables originales que tengan varianza máxima. Es decir, se obtendrá maximizando la varianza de las proyecciones que si lo expresamos en términos de las variables originales esto supone maximizar:

$$M = \sum_{i=1}^p a_i^2 s_i^2 + 2 \sum_{i=1}^p \sum_{j=i+1}^p a_i a_j s_{ij}$$

Ecuación 11 (41)

Con la restricción  $\sum a_i^2 = 1$  y en donde  $s_i^2$  corresponde a la varianza ( $s^2$ ) de la variable ( $i$ ) y  $a_i$  corresponde al vector unitario de la variable ( $i$ ).

Los valores del primer componente estarán representados por un vector  $Z_1$ , dado por:  $Z_1 = \sum a_i X_i$  (41)

Cuando una variable tenga una varianza mucho mayor que las otras el primer componente principal coincidirá muy aproximadamente con esta variable. Por lo tanto cuando las variables tienen unidades distintas esta propiedad no es conveniente ya que la maximización de  $M$  (ecuación 11) dependerá fundamentalmente de la escala de medida y las variables más grandes tendrán más peso en el análisis (41). En este trabajo de investigación tenemos variables en unidades de medición distinta, por lo tanto, proponemos estandarizar las variables antes de calcular los componentes principales, para que así las magnitudes de los valores numéricos de las variables  $X$  sean similares. Mediante esta estandarización la ecuación a maximizar se transforma en:

$$M = 1 + 2 \sum_{i=1}^p \sum_{j=i+1}^p a_i a_j r_{ij}$$

Ecuación 12 (41)

Siendo  $r_{ij}$  el coeficiente de correlación lineal entre las variables  $ij$ , con esto la solución depende de las correlaciones y no de las varianzas y los *componentes principales normados* o *correlacionados* se obtendrán calculando los vectores y valores propios de la matriz **R** (matriz de correlación).

Una vez realizado el análisis de componentes principales mediante la utilización de matriz de correlación podremos entonces realizar la regresión logística y así poder determinar la capacidad diagnóstica de la preeclampsia de los biomarcadores a encontrar en el FGC.

## 5.2 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

### 5.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio transversal de caso-control con muestra de conveniencia. Esto quiere decir que es un estudio preliminar en donde no se incluirían casos dudosos o complicados.(30)

### 5.2.2 UNIVERSO Y MUESTRA:

- **Universo:** Embarazadas, entre 22 y 33 semanas de gestación.

- **Muestra:** Embarazadas del Hospital Sótero del Río con diagnóstico de preeclampsia y mujeres embarazadas del mismo recinto sanas. Ambas con semanas de gestación entre 22 y 33 semanas. La muestra será seleccionada “a demanda” y por cada caso se escogerán 2 controles (razón de muestreo de 2:1).

En esta primera etapa (*Fase Exploratoria*) de desarrollo del test diagnóstico para la preeclampsia mediante biomarcadores a encontrar en el FGC es fundamental establecer el tamaño de muestra necesario a utilizar. Como bien se ha planteado anteriormente en este estudio pretendemos tener dos grupos, casos (mujeres con diagnóstico de preeclampsia) y controles (mujeres con diagnóstico negativo de preeclampsia – “gold standard”), en donde se asume que estas provienen de dos poblaciones binomiales independientes.

Anteriormente se ha mencionado la importancia de determinar la sensibilidad y la especificidad, ambas probabilidades de un test diagnóstico. De aquí surge una tercera probabilidad importante de mencionar, el Likelihood Ratio positivo (LR+), una razón de probabilidades definida como:

$$LR+ = \frac{P(+|Enfermo)}{P(+|Sano)} = \frac{S}{1 - E}$$

Ecuación 13 (43)

Es decir, la probabilidad de tener un examen positivo cuando el sujeto está verdaderamente enfermo dividido por la probabilidad de que el examen de positivo cuando el sujeto está sano. En ambos, tanto numerador como denominador contienen la misma probabilidad (sujeto positivo) pero en poblaciones distintas (Enfermos y Sanos).

De aquí que, en esta primera instancia, bastará con detectar la diferencia de proporciones:  $P_x$  y  $P_y$ , en donde  $P_x$  = sensibilidad y  $P_y$  = 1 – Especificidad, utilizando la siguiente fórmula:

$$n_0 = \frac{\left( Z_{\alpha} \sqrt{P_x(1 - P_x)} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_y(1 - P_y)} \right)^2}{(P_x - P_y)^2}$$

Ecuación 14 (43)

En donde:

$Z_{\alpha}$  = correspondería al valor obtenido de la tabla de distribución normal para un  $\alpha$  determinado, siendo  $\alpha$ : el nivel de significación de la prueba, éste corresponde al error tipo I, es decir a la probabilidad de rechazar  $H_0$  cuando en la realidad no existen diferencias entre los casos y controles ( $H_0$  es verdadera). Los valores comúnmente utilizados y aceptados son 0.05 y 0.01 que corresponde a valores de  $Z_{1-\alpha/2}$  (para una prueba de 2 colas) de 1.960 y 2.576 respectivamente (44).

$Z_{1-\beta}$  = estos valores también se obtienen de la tabla de distribución normal y para su cálculo se debe establecer la potencia que va a tener la prueba de hipótesis. La potencia ( $1 - \beta$ ), se refiere a la probabilidad de rechazar  $H_0$  cuando en realidad si existen diferencias entre los dos grupos. Es importante tener en claro que realizar estudios con baja potencia pueden llevar a implicancias bioéticas ya que se expone a los participantes a riesgos y cargas de investigación cuando no hay utilidad científica en ellos, por lo que comúnmente se intenta trabajar con valores elevados de potencia que se establecen en 0.8 o más ya que esto nos deja una probabilidad de error ( $\beta$ ) de 20% o menos (44,45).

$P_x$  y  $P_y$  = corresponden a la sensibilidad y 1-especificidad respectivamente. En el diseño de pruebas o test diagnósticos es ideal encontrar una alta sensibilidad y así también especificidad. En particular para el diagnóstico de la preeclampsia la no detección de enfermedad conlleva un riesgo vital no sólo para el feto sino también para la madre por lo que es fundamental que la sensibilidad sea alta. Por esto es que nos fijaremos una sensibilidad del 90%. Por otra parte, la especificidad en los test diagnósticos también debería ser elevada ya que se estará diagnosticando correctamente sin preeclampsia a aquellas mujeres que están libres de enfermedad y por ende no se estará sometiendo a embarazadas



a procedimientos diagnósticos y pruebas de laboratorio innecesarias y estresantes para ella, basándonos en esto también fijaremos y esperaremos tener una especificidad del 90%. Considerando estos dos elementos de una prueba diagnóstico en desarrollo y con potencial uso en un futuro es que no nos debemos olvidar de la razón de verosimilitud positiva, esta es la razón entre: la probabilidad que un test de positivo, (entre los sujetos realmente enfermos), y la probabilidad que un test de positivo, (entre los sujetos realmente sanos) (33). En otras palabras, la LR+ nos indica cuanto más probable es tener un positivo en un enfermo que en un sano.

Basándonos en la sensibilidad y especificidad deseada, obtendríamos un LR+ de 9. Según Jaeschke, Guyatt, et.al. (46) si el LR+ es  $> 10$  entonces el test diagnóstico tendrá una mejora en la probabilidad diagnóstica en los enfermos. Si el LR+ es  $> 5$  y  $\leq 10$  se clasifica como moderado y si es  $> 2$  y  $\leq 5$  como leve, según esta clasificación el LR+ de nuestro test sería moderada muy cercana a alta lo que sería bastante adecuado médicamente, ya que una embarazada con preeclampsia tendría 9 veces más probabilidades de ser diagnosticada como tal que una sana.

El último aspecto importante a considerar en el cálculo del tamaño de la muestra necesaria para este trabajo de investigación con un grupo caso y un grupo control es utilizar una razón de muestreo 1:2. Esto debido a la baja prevalencia de preeclampsia que fluctúa entre 3% a 7% y también a que la elección del grupo control es bastante más accesible. Al realizar estudios con una razón de muestreo 1:2 se logra aumentar la potencia de éste, no así al hacer 1:3 o 1:4 (47)

En base a lo anterior y utilizando el software Stata ® versión 14.2, con su comando **power**, obtenemos lo siguiente:

**power twoprop .9 .1, power(0.9) a(0.01) nratio(2)**

$n_1$  = número de casos necesarios = 7

$n_2$  = número de controles necesarios = 14

Si a esto le sumamos la probabilidad de pérdida de casos de un 15%, es que necesitaríamos cómo mínimo de 9 casos ( $n_1$ ) y 18 controles ( $n_2$ ) para constituir una muestra que sea representativa según nuestros criterios establecidos anteriormente. Sumado a esto no podemos dejar de lado el considerar la prevalencia de la enfermedad (preeclampsia). Basándonos en el artículo de “Tamaño de muestra para pruebas diagnósticas” (43) y ya teniendo el número mínimo de sujetos enfermos (casos) necesarios es que podemos determinar el número de sujetos sanos (control):

$$n_{sanos} = \left( \frac{1-p}{p} \right) * n_{enfermos}$$

Ecuación 15 (43)

En donde  $n_{enfermos} = 9$  corresponde al valor de número de casos calculados anteriormente ( $n_1 = 9$ ) y  $p$  = prevalencia. Usaremos un punto medio de 5% de prevalencia entre lo reportado en la literatura, que fluctúa entre un 3% y 7% (3). Con estos datos el número de sujetos sanos necesarios es de 171.

En resumen, nuestro tamaño muestral considerando los parámetros anteriormente expuestos estará constituido por:

$$n_{enfermos} = 9$$

$$n_{sanos} = 171$$

### 5.2.3 VARIABLES O TÓPICOS DE ESTUDIO

- **Tipo de Paciente:** variable categórica y dicotómica

- Casos: + diagnóstico de preeclampsia
- Control: - diagnóstico de preeclampsia

Categorización basada en el **diagnóstico clínico de preeclampsia**, realizado por el ginecólogo del Hospital Sótero del Río utilizando prueba de laboratorio (proteinuria) y clínica (hipertensión) para su diagnóstico.

- **Biomarcadores - Exosomas:**

- PLAP (fosfatasa alcalina de placenta): variable intervalar continua (pg/ml)
- CD63 (marcador específico de exosomas, glicoproteína 53): variable intervalar continua (cantidad de partículas)
- PIGF (factor de crecimiento placentario): variable intervalar continua (pg/ml)
- SFLT-1 (tirosina cinasa-1 símil-fms soluble): variable intervalar continua (pg/ml)

### 5.2.4 ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL TRABAJO EN TERRENO:

No se realizaron trabajos en terreno relacionados al área estadística. Sólo actividades en relación a la toma de muestras de fluido gingival crevicular en el Hospital Sótero del Río, durante un período de 5 meses.

### 5.2.5 MÉTODOS O PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN E INSTRUMENTOS UTILIZADOS:

Para la toma de muestra se recolectaron 16 conos de papel de fluido gingival crevicular (4 por cada cuadrante, para obtener mayor representatividad de la boca). Cada muestra fue rotulada con códigos y almacenadas a las temperaturas indicadas para su posterior análisis en laboratorio.

### **5.2.6 TÉCNICA DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN:**

El procesamiento de las muestras para el test de ELISA se realizó en CIBRO (Centro de Investigación en Biología y Regeneración Oral, de la Universidad los Andes) y mediante la técnica proteómica y espectro-fotometría de masas en la Universidad de Queensland, Australia.

Los datos entregados fueron tabulados según:

- El tipo de biomarcador obtenido con su respectiva concentración detectada

- Tipo de paciente: caso (paciente con preeclampsia diagnosticada) o control (paciente sin preeclampsia)

Para el procesamiento de la información estadística se utilizó el software Stata ® versión 14.2 (StataCorp). 2013. Stata: Release 14. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP).

### **5.2.7 ASPECTOS ÉTICOS:**

El comité de ética de las Universidad de los Andes aprueba la realización del estudio y todas las mujeres reclutadas firmaron el consentir voluntariamente y por escrito su participación en el estudio (ver anexos).

### **5.2.8 FINANCIAMIENTO:**

Proyecto *CORFO L1 13IDL2-25434* – “Diseño de Kit de diagnóstico de Preeclampsia”,

Proyecto *Fondef Idea ID16I10452* – “Diseño de un screening prenatal para el diagnóstico temprano de preeclampsia basado en la detección biomarcadores placentarios en fluidos orales de *embarazadas*”.

## 6 CAPÍTULO VI: RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y REDUCCIÓN DE VARIABLES

La base de datos obtenida está constituida por 10 casos de mujeres embarazadas diagnosticadas con preeclampsia y 171 mujeres embarazadas sanas. De las 181 mujeres se obtuvieron las concentraciones de los biomarcadores a estudiar (PIGF, PLAP, SFLT-1 y CD63). PIGF, PLAP y SFLT-1 fueron medidos en pg/ml y CD63 se cuantificó la cantidad de partículas presentes.

La tabla 1 y los gráficos 1 – 4, nos muestra la distribución de las variables a estudiar, diferenciando por el diagnóstico (sana = 0 y enferma = 1) de las pacientes. Las variables PLAP y SFLT-1 presentan un promedio mayor para las pacientes diagnosticadas con preeclampsia en comparación a las sanas a diferencia de PIGF y CD63 donde ocurre lo contrario. Al analizar la distribución de los datos, según diagnóstico, mediante el Test de Shapiro-Wilk, solo PLAP distribuye normal ( $p < 0.05$ ), por lo que si describimos nuestras variables en función de la mediana vemos que PIGF y CD63 tienen medianas mayores para pacientes sanas, en cambio SFLT-1 y PLAP tienen medianas mayores para el grupo de paciente con diagnóstico de preeclampsia, igual a como se observó con el promedio.

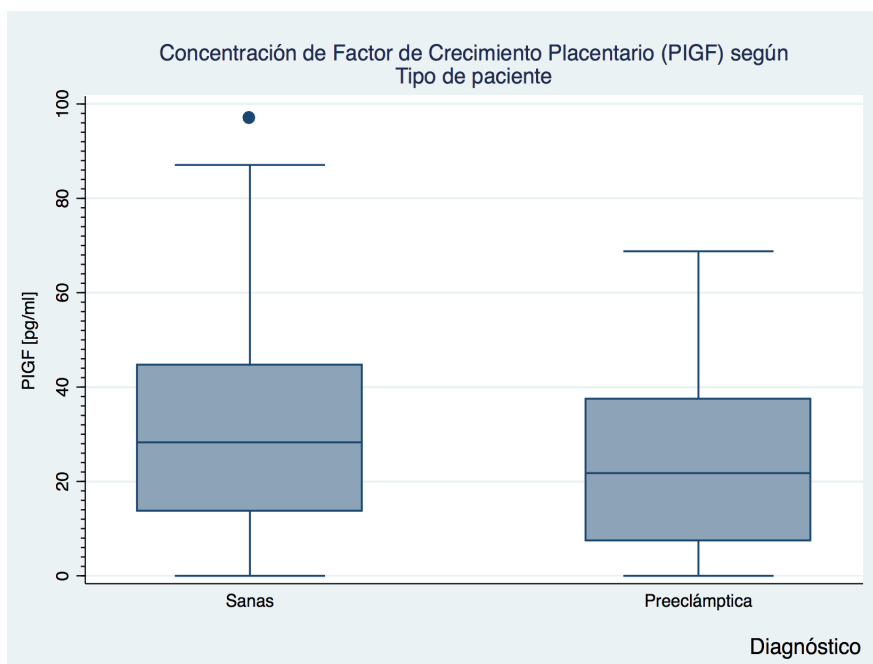
**Tabla 1. Descripción biomarcadores según diagnóstico de las pacientes\*<sup>1</sup>:**

|               | Dx* <sup>2</sup> . | N   | Mínimo   | Máximo   | Promedio | D.S.     | P50      | IQR      |
|---------------|--------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>PIGF</b>   | 0                  | 171 | 0        | 96.932   | 30.582   | 21.093   | 28.288   | 30.788   |
|               | 1                  | 10  | 0        | 68.778   | 23.632   | 20.788   | 21.759   | 30.040   |
| <b>SFLT-1</b> | 0                  | 171 | 35.807   | 132.953  | 80.505   | 19.252   | 79.693   | 25.021   |
|               | 1                  | 10  | 70.987   | 280.746  | 127.155  | 65.864   | 100.313  | 61.635   |
| <b>PLAP</b>   | 0                  | 171 | 75.993   | 149.246  | 113.894  | 12.911   | 114.993  | 20.315   |
|               | 1                  | 10  | 119.905  | 265.105  | 169.634  | 51.825   | 144.356  | 69.967   |
| <b>CD63</b>   | 0                  | 171 | 501924.4 | 4.05e+10 | 8.25e+09 | 6.93e+09 | 7.35e+09 | 1.06e+10 |
|               | 1                  | 10  | 2.42e+08 | 5.21e+09 | 1.74e+09 | 1.56e+09 | 1.27e+09 | 2.29e+09 |

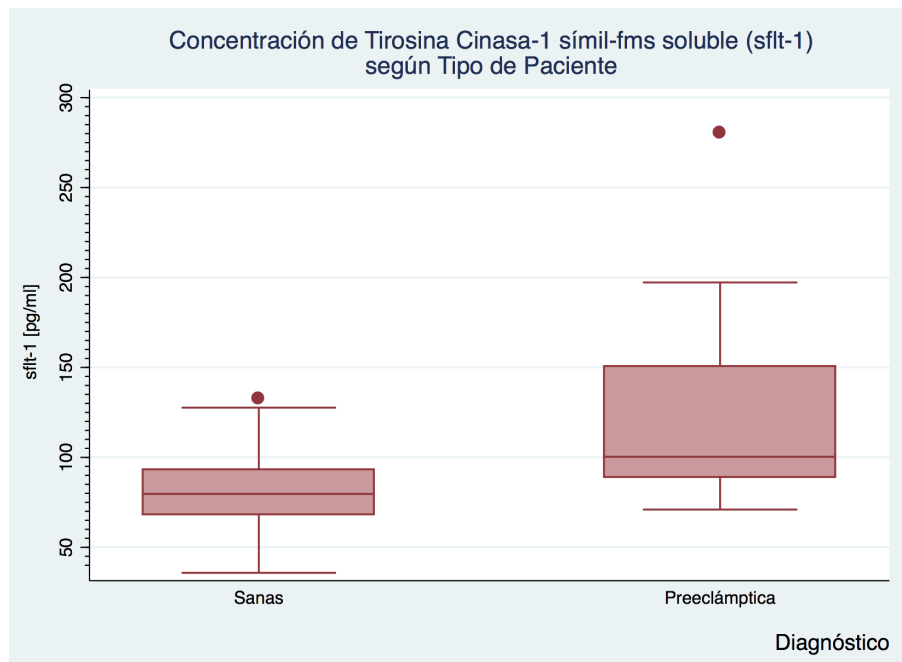
\*<sup>1</sup> = Dx: diagnóstico / D.S.: desviación standard / P50: mediana / IQR: rango intercuartílico

\*<sup>2</sup> = 0: sana, 1: preeclampsia

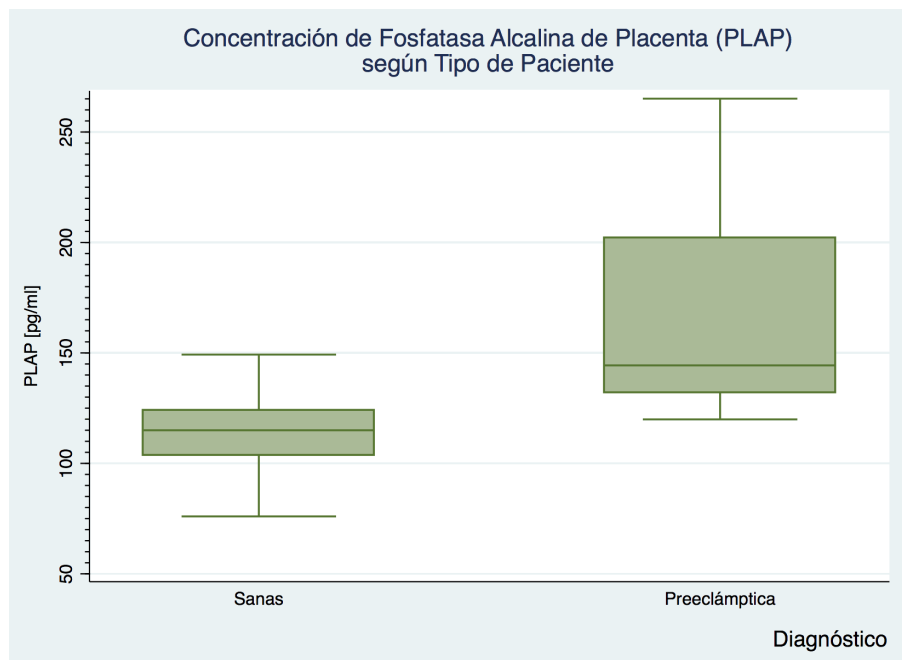
**Gráfico 1. Concentración de Factor de Crecimiento Placentario (PIGF) según tipo de paciente**



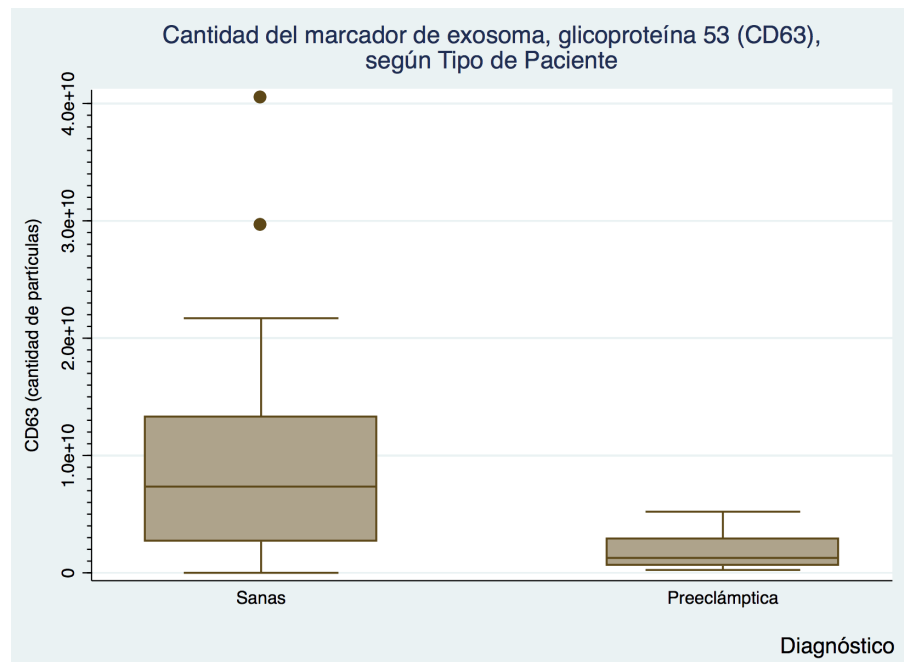
**Gráfico 2. Concentración de Tirosina Cinasa-1 símil-fms soluble (sflt-1) según tipo de paciente**



**Gráfico 3. Concentración de Fosfatasa Alcalina de Placenta (PLAP) según tipo de paciente**



**Gráfico 4. Cantidad del marcador del exosoma, glicoproteína 53 (CD63) según tipo de paciente**



Posteriormente se realizó el análisis de correlación, donde se observó (ver tabla 2) una alta correlación entre todas las variables y todas ellas significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 2. Análisis de Correlación entre biomarcadores**

|               | <i>PIGF</i>      | <i>SFLT-1</i>    | <i>PLAP</i>      | <i>CD63</i> |
|---------------|------------------|------------------|------------------|-------------|
| <i>PIGF</i>   | 1.000            |                  |                  |             |
| <i>SFLT-1</i> | 0.3787<br>0.0000 | 1.000            |                  |             |
| <i>PLAP</i>   | 0.8505<br>0.0000 | 0.3398<br>0.0000 | 1.000            |             |
| <i>CD63</i>   | 0.4222<br>0.0000 | 0.5313<br>0.0000 | 0.3367<br>0.0000 | 1.000       |



Por lo que se consideró adecuado realizar el análisis de componentes principales. Previo a éste, se estandarizaron las variables, ya que tres de ellas medían concentración [pg/ml] y la cuarta variable cuantificaba cantidad de partículas, mediante la siguiente ecuación:

$$Z_i = \frac{Valor_i - \bar{X}_i}{DS_i}$$

Ecuación 16

En donde  $i$  corresponde a las variables en estudio.

Al realizar el análisis de componentes principales (ver anexo tabla 1), se logra explicar el 85% de la varianza con los componentes 1 y 2 (cp1 y cp2). Luego se generaron los valores correspondientes a los 2 primeros componentes que se utilizaron a continuación en la regresión logística y curva ROC.

## **6.2 REGRESIÓN LOGISTA, CURVA ROC**

Al realizar la regresión logística se obtiene el siguiente modelo en base a los componentes principales 1 y 2 seleccionados:

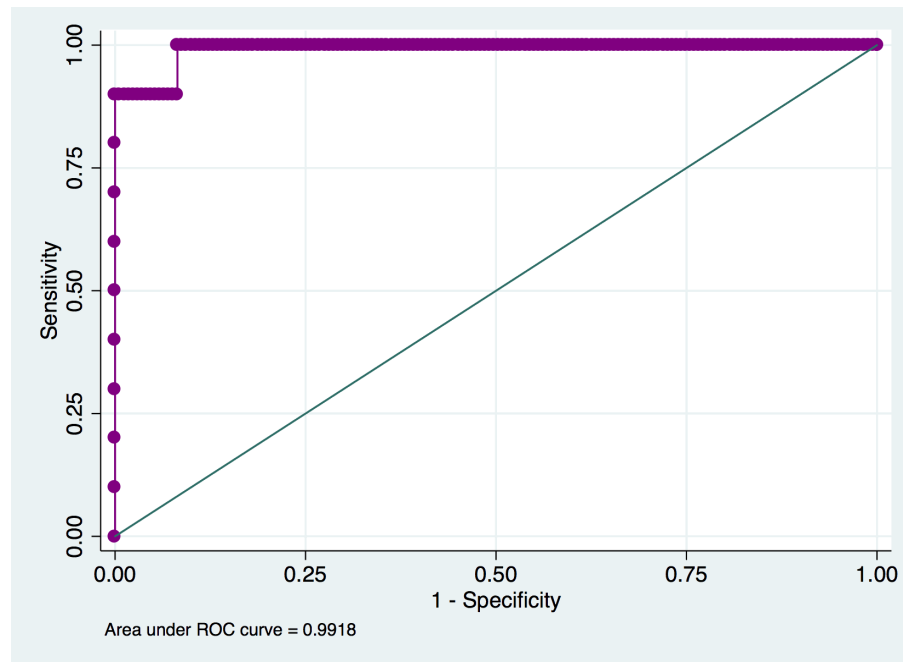
$$\ln(Odds(A)) = a + \beta X ; A = \text{evento de tener preeclampsia}$$

$$\ln(Odds(A)) = -9.9704 - 0.1405cp1 - 8.9024cp2$$

Con una correlación de 0.834. Un  $p=0.819$  para el componente principal 1 y de 0.007 para el componente principal 2, (ver tabla 2 en anexos para más detalles).

Luego se realizó la curva ROC obteniéndose un área bajo la curva de 99.18%, ver gráfico 5.

**Gráfico 5. Curva ROC para componente principal 1 y 2**



Finalmente se obtuvo el modelo final expresado en base a las variables PIGF, SFLT-1, PLAP y CD63 (ver tabla 3 y 4 en anexo para los detalles):

$$\begin{aligned} \ln(\text{Odds}(A)) = & -9.9704 - 0.1405(0.0208PIGF + 0.0215SFLT1 + 0.0252PLAP \\ & + 6.51e^{-11}CD63) - 8.9024(0.0268PIGF - 0.0154SFLT1 - 0.0228PLAP \\ & + 7.69e^{-11}CD63) \end{aligned}$$

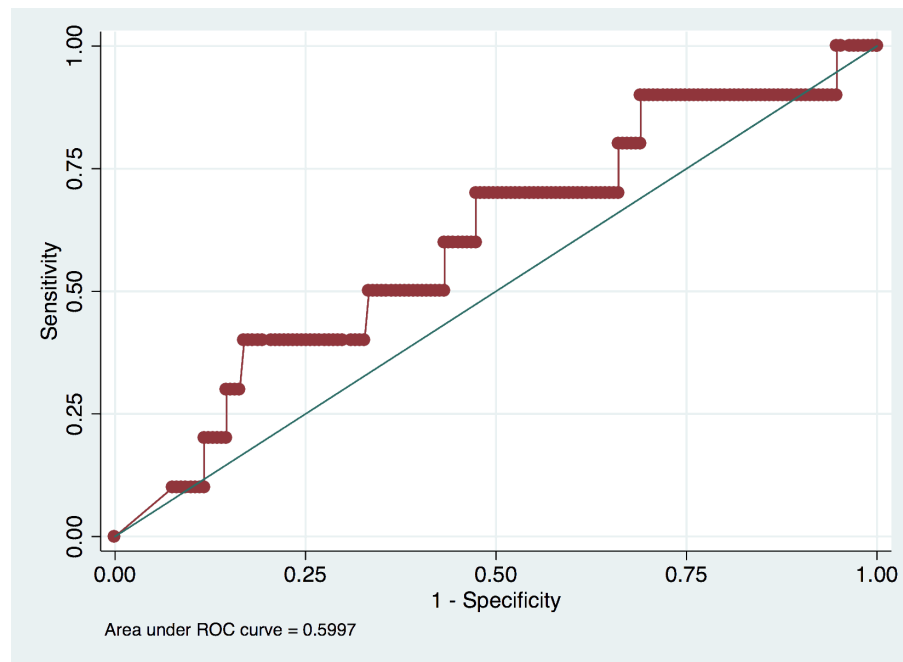
$A = \text{evento de tener preeclampsia}$

Uno de los objetivos fue determinar si bastaba con un solo biomarcador presente en FGC para el diagnóstico de preeclampsia o si es necesario la utilización de múltiples biomarcadores. Para ello, además del análisis en conjunto de los biomarcadores mencionado anteriormente, que incluyó el uso de componentes principales, se realizaron las regresiones logísticas (ver anexo tablas 5-8) y curvas ROC (gráficos 6-9) de forma individual

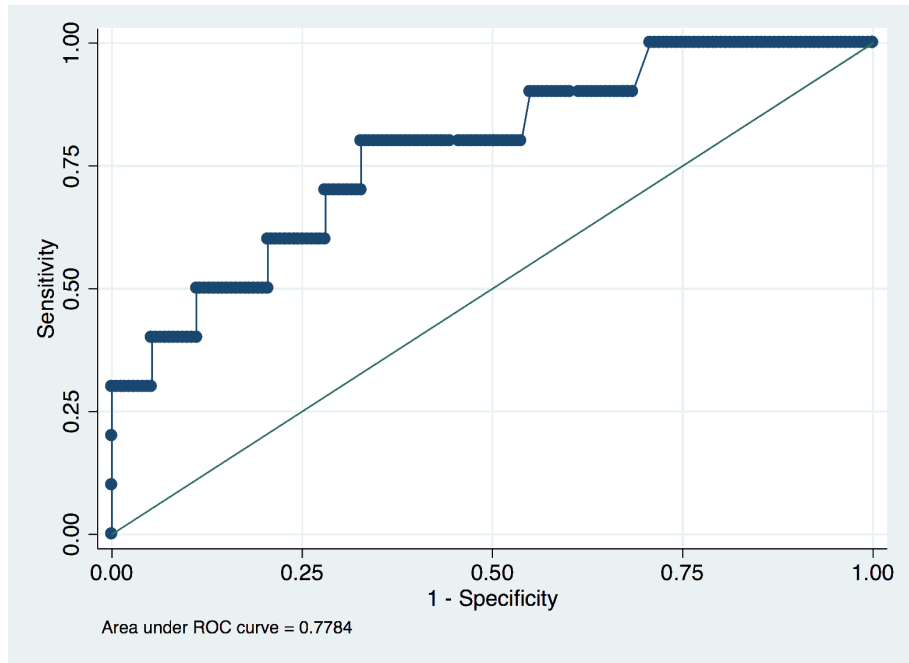
para cada biomarcador detectado en el FGC. El área de las curvas ROC obtenidas de forma individual fueron comparadas entre sí para comprobar su igualdad, mediante el algoritmo desarrollado por DeLong, E. R., D. M. DeLong, y D. L. Clarke-Pearson (33).

La menor área bajo la curva fue de 0.5997 (gráfico 6) para el biomarcador PIGF. SFLT-1 y CD63 tuvieron curvas ROC bien similares, 0.7784 y 0.7956 respectivamente (gráficos 7 y 9) y PLAP obtuvo la mayor curva ROC individual de 0.9251 (grafico 8).

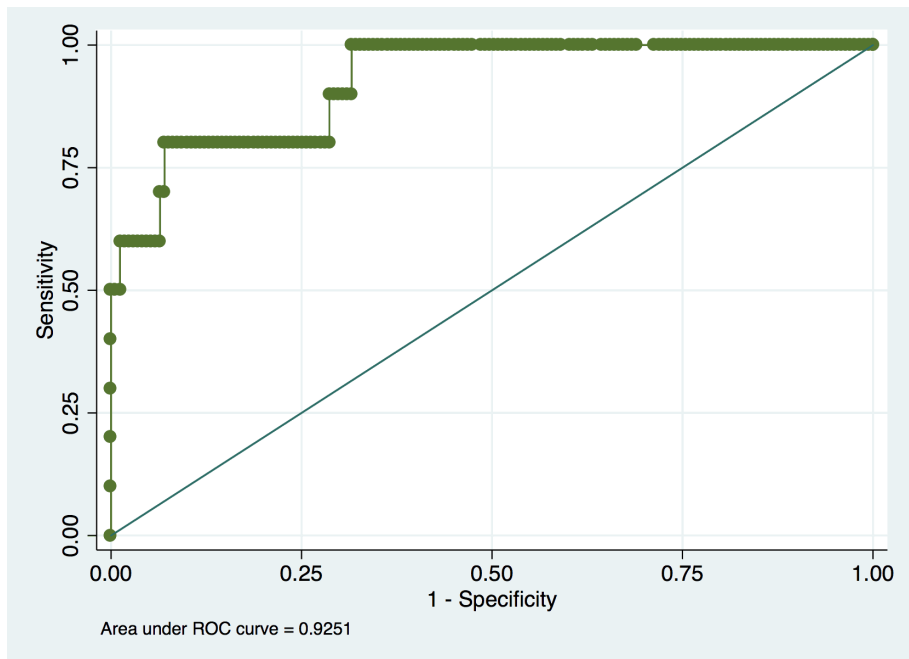
**Gráfico 6. Curva ROC para PIGF**



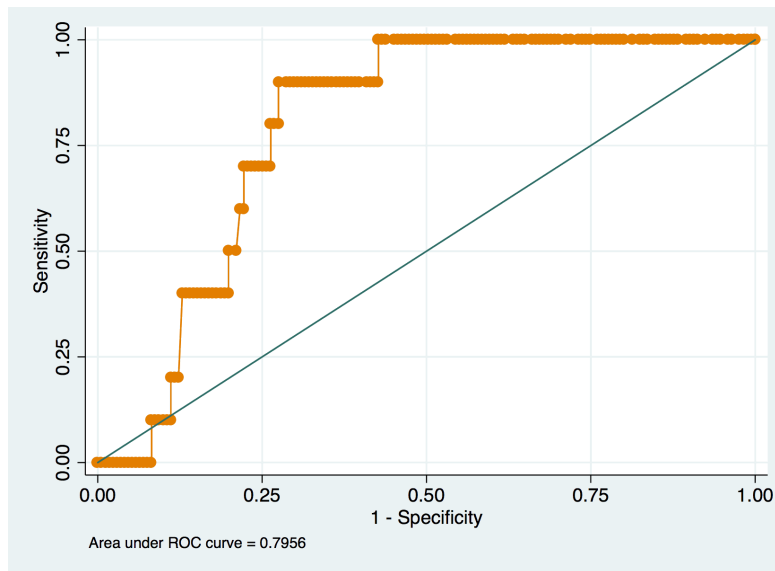
**Gráfico 7. Curva ROC para sflt-1**



**Gráfico 8. Curva ROC para PLAP**

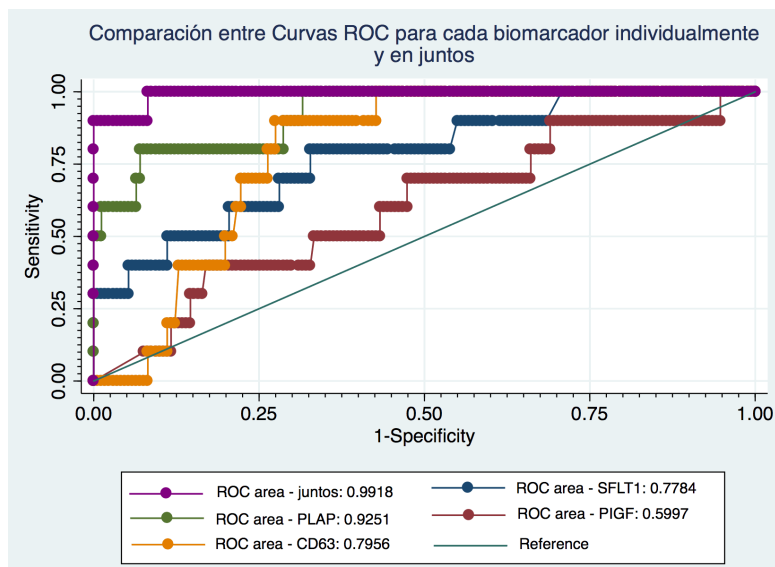


**Gráfico 9. Curva ROC para CD63**



Al realizar la comparación entre las 5 curvas ROC (ver anexo tabla 9), es decir, las 4 curvas ROC individuales de: SLFT-1, PIGF, PLAP y CD63, más la curva ROC estimada anteriormente en base a los componentes principales, si se observan diferencias entre ellas ( $p = 0.00001$ , grafico 10).

**Gráfico 10. Comparación Curvas ROC**



La tabla 3 muestra un resumen entre que curvas ROC se observan diferencias significativas. La curva ROC creada con todos los biomarcadores juntos (mediante componentes principales) muestra diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con todas las curvas ROC realizadas con los biomarcadores de forma individual salvo con la creada con PLAP en donde no hay diferencias ( $p = 0.061$ ).

**Tabla 3. Resumen de los valores p encontrados al comparar las curvas ROC según los biomarcadores de forma individual y en conjunto.**

|                                   | <b>PLAP</b><br>Área ROC: 0.9251 | <b>SFLT-1</b><br>Área ROC: 0.7784 | <b>CD63</b><br>Área ROC: 0.7956 | <b>JUNTAS</b><br>Área ROC: 0.9918 |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <b>PIGF</b><br>Área ROC: 0.5997   | P = 0.005                       | P = 0.254                         | P = 0.049                       | P = 0.0001                        |
| <b>PLAP</b><br>Área ROC: 0.9251   |                                 | P = 0.020                         | P = 0.047                       | P = 0.061                         |
| <b>SFLT-1</b><br>Área ROC: 0.7784 |                                 |                                   | P = 0.838                       | P = 0.004                         |
| <b>CD63</b><br>Área ROC: 0.7956   |                                 |                                   |                                 | P = 0.0000                        |

## 7 CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN O COMENTARIOS

Como pudimos observar, si bien el cálculo del tamaño muestral necesario de casos fue de 9 embarazadas con diagnóstico de preeclampsia, se tuvo acceso a 10 casos por lo que se decidió incluirlos todos ya que el cálculo realizado establecía un número mínimo a recolectar. En los resultados del análisis descriptivo de la muestra, tanto las concentraciones de PIGF como de CD63 están disminuidas en las pacientes con preeclampsia vs las pacientes sanas. Esto es coincidente con la literatura en donde se ha reportado una disminución de PIGF en pacientes que presentan presión arterial alta y riesgo de preeclampsia (5,17,26). En cuanto a CD63, los resultados obtenidos son opuestos a la literatura, en donde se reportan mayores niveles de CD63 en mujeres con preeclampsia versus sanas (40,48,49). La posible diferencia en la cantidad de partículas de CD63 encontrada en el fluido gingival crevicular, en ambas condiciones de las pacientes, versus lo que dice la literatura puede deberse al método de detección y a que esta es la única variable utilizada que cuantificaba cantidad de partículas versus las otras que cuantificaban concentración (en pg/ml). Por otra parte, la cantidad de partículas disponibles en el fluido gingival crevicular podría ser menor debido a barreras biológicas que disminuyan su paso desde el plasma a la cavidad oral. Así también, los resultados obtenidos para SFLT-1 y PLAP donde se observó un aumento en las pacientes con preeclampsia se condice con la literatura (50–54).

En el análisis de componentes principales, utilizado como herramienta para eliminar la colinealidad observada entre los distintos biomarcadores, se seleccionaron los dos primeros componentes ya que con ellos se logra explicar casi el 85% de la variabilidad de las variables. Si bien al mirar la regresión logística de dichos componentes en función al diagnóstico de preeclampsia nos damos cuenta que el primer componente principal (cp1) no es estadísticamente significativo en el modelo ( $p=0.819$ ) lo que podría sugerir retirarlo. Esto no fue realizado así ya que según Fletcher (29), el uso de diversos test (que en este caso

correspondería al uso de diversos biomarcadores) permite lograr un diagnóstico correcto más acertado. Así también, es fundamental considerar la *plausibilidad biológica*. Término que hace referencia a la coherencia con los conocimientos biológicos actuales, en donde se busca que haya una cierta coherencia entre los conocimientos epidemiológicos y los biológicos. Esta plausibilidad biológica estará dada por los conocimientos que se tengan en el minuto del estudio y/o situación (29,55). Por esto que resulta más adecuado dejar los 2 componentes principales en nuestro modelo logístico ya que el retiro de uno de los componentes llevaría a tener una ecuación mucho menos precisa a sabiendas que todos ellos están presentes y sufren alteraciones cuando hay preeclampsia, siendo útiles en el diagnóstico de preeclampsia + (3, 5, 6, 32, 37, 46, 50, 51, 54–56). Así es que resulta fundamental realizar el análisis de componentes principales e incluir los 2 primeros, en donde logramos explicar casi el 90% de la variabilidad.

Si comparamos las distintas curvas ROC realizadas en este análisis, vemos claramente que sólo 2 curvas logran un área sobre 90%, la curva ROC estimada con el biomarcador PLAP y la estimada con todos los biomarcadores juntos (mediante componentes principales). Ésta última es la mayor, alcanzando un valor de 0.9918, en comparación a la de PLAP que es de un 0.9251. Si bien estadísticamente no se observaron diferencias entre ambas curvas, se considera fundamental elegir el modelo completo ya que logramos una mayor área bajo la curva ROC y por ende obtendremos una alta sensibilidad y especificidad, ambas muy necesarias en el diagnóstico de preeclampsia. Cuando el área bajo la curva es igual a 1, significa que el test diagnóstico es perfecto en diferenciar entre pacientes enfermos y sanos (en este caso paciente con preeclampsia y sin preeclampsia) y por ende no hay presencia de falsos positivos ni falsos negativos (57). Tener alta sensibilidad implica una alta detección de casos cuando la enfermedad esté presente y se evitan las consecuencias, que podrían llegar a ser fatales, de la no detección (29). En el caso de la preeclampsia la no detección de ésta,



trae consigo consecuencias para la madre como también para el feto (3). Y con la especificidad ocurre lo mismo, ya que el diagnóstico de preeclampsia implica cuidados excesivos para la madre y el feto e incluso en un alto porcentaje la necesidad de la interrupción del embarazo con las consecuencias que eso puede conllevar al bebe que debe nacer tempranamente y los altos riesgos de complicaciones y cuidados. Además, podemos agregar posibles daños físicos y psicológicos para la madre. Por esto una alta especificidad permitirá reducir también los falsos-positivos obtenidos. A mayor cercanía del área de la curva ROC a 1 más discriminante es nuestro test, fundamental en una enfermedad como la preeclampsia (29). Sumado a esto tenemos lo expuesto por Zhou con Obuchowski y McClish (31), en donde destacan que en la *Fase Exploratoria* de un test diagnóstico (etapa a la que corresponde este estudio) la estimación de la curva ROC tienden a estar “sobrevaloradas” y por ende más nos hace avalar la elección del modelo completo para que en una situación real esta estimación de 0.9918 si bien podría bajar se mantenga en valores cercanos a 1.

Por último, con respecto al tamaño muestral no podemos olvidar que todos estos análisis fueron realizados para un estudio en *Fase Exploratoria* (31), con mujeres claramente identificadas con preeclampsia y en base a una sensibilidad y especificidad del 90%. Esto nos da un LR+ de 9, que según Jaeschke, Guyatt, et.al. (46) correspondería a un test diagnóstico moderado, en donde una embarazada con preeclampsia tendría 9 veces más probabilidades de ser diagnosticada como tal que una sana. Por lo que sería interesante postular un aumento en el tamaño de la muestra que permita llevar al test diagnóstico por sobre un LR+ de 10.

## 8 CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES:

La utilización de biomarcadores (PIGF,SFLT-1, PLAP y CD63) detectados en el FGC, en este estudio en *Fase Exploratoria*, son una buena herramienta para discriminar los pacientes sanos versus enfermos (con preeclampsia).

Si bien la utilización en conjunto de estos biomarcadores no presenta diferencias significativas con respecto al área bajo la curva ROC en comparación a utilizar el biomarcador PLAP solamente. Se considera que clínicamente es relevante obtener una curva ROC lo más cercana a 1 que nos asegure una sensibilidad y especificidad lo más alta posible, para así lograr una correcta discriminación entre las pacientes con preeclampsia y las sanas.

## 9 CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA:

1. Turner JA. Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. *Int J Womens Health*. 2010 Jan;2:327–37.
2. Parra M, San Martín A, Valdés E, Hasbún J, Quiroz V. Espectro Clínico de la preeclampsia: estudio comparativo de sus diversos grados de severidad. *REV CHIL Obs GINECOL*. 2007;72(3):169–75.
3. Al-Jameil N, Aziz Khan F, Fareed Khan M, Tabassum H. A brief overview of preeclampsia. *J Clin Med Res*. 2014 Feb;6(1):1–7.
4. Donoso S E. Mortalidad materna en Chile, 2000-2004. *Rev chil Obs ginecol*. 2006;71:246–51.
5. Hirashima C, Ohkuchi A, Arai F, Takahashi K, Suzuki H, Watanabe T, et al. Establishing reference values for both total soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and free placental growth factor in pregnant women. *Hypertens Res*. 2005 Sep;28(9):727–32.
6. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One*. 2014 Jan;9(6):e98667.
7. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov;5(6):463–6.
8. Gosho M, Nagashima K, Sato Y. Study designs and statistical analyses for biomarker research. *Sensors (Basel)*. 2012 Jan;12(7):8966–86.
9. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, Guzman Y a, Garcia B a, Floudas C a. Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. *J Clin Periodontol*. 2013 Feb;40(2):131–9.
10. Spielmann N, Wong D. Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. Vol. 17, *Oral Diseases*. 2011. p. 345–54.
11. Michael a, Bajracharya SD, Yuen PST, Zhou H, Star R a, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):34–8.
12. Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. Second Edi. Principles of Biostatistics. Belmont: Books/Cole; 2000. 135-149 p.
13. Pepe M, Longton G, Janes H. Estimation and Comparison of Receiver Operating Characteristic Curves. *Stata J*. 2009;9(1):1–16.
14. Chappell LC, Bramham K, Shennan AH. Short-term prediction of preeclampsia: how close are we? *Biomark Med*. 2014 Apr;8(4):455–8.
15. Thangaratinam S, Ismail KMK, Sharp S, Coomarasamy A, Khan KS. Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: a systematic review. *BJOG*. 2006 Apr;113(4):369–78.

16. Thangaratinam S, Koopmans CM, Iyengar S, Zamora J, Ismail KMK, Mol BWJ, et al. Accuracy of liver function tests for predicting adverse maternal and fetal outcomes in women with preeclampsia: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Jun;90(6):574–85.
17. Liu LY, Yang T, Ji J, Wen Q, Morgan A a, Jin B, et al. Integrating multiple “omics” analyses identifies serological protein biomarkers for preeclampsia. *BMC Med*. 2013 Jan;11(1):236.
18. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 2013 Oct;7(5):769–78.
19. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan;14(3):5338–66.
20. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol*. 1997 Mar;2(1):123–37.
21. AlRowis R, AlMoharib HS, AlMubarak A, Bhaskardoss J, Preethanath RS, Anil S. Oral fluid-based biomarkers in periodontal disease - part 2. Gingival crevicular fluid. *J Int oral Heal JIOH*. 2014 Sep;6(5):126–35.
22. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*. 2010 Jan;81(1):89–98.
23. Masters JM, Noyce AJ, Warner TT, Giovannoni G, Proctor GB. Elevated salivary protein in Parkinson’s disease and salivary DJ-1 as a potential marker of disease severity. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Jul 23;
24. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med*. 2014 Jan;12(1):204.
25. Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2017 Mar 8];190(4):1128–34.
26. Dover N, Gulerman HC, Celen S, Kahyaoglu S, Yenicesu O. Placental growth factor: as an early second trimester predictive marker for preeclampsia in normal and high-risk pregnancies in a Turkish population. *J Obstet Gynaecol India* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Mar 8];63(3):158–63.
27. Palm M, Basu S, Larsson A, Wernroth L, Åkerud H, Axelsson O. A longitudinal study of plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), placental growth factor (PlGF), sFlt1: PlGF ratio and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(11):1244–51.
28. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Jan;206(1):58.e1-8.

29. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia Clínica: Aspectos Fundamentales*. Segunda Ed. MASSON-Williams & Wilkins España, S.A.; 1998. 43-74-255 p.
30. Carnero-Pardo C. Evaluación de las pruebas diagnósticas. *Rev Neurol*. 2005;40(11):641–3.
31. Zhou X-H, Obuchowski N, McClish D. *Statistical Methods in Diagnostic Medicine*. Second Edi. Balding D, Cressie N, Fitzmaurice G, editors. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. 3-6, 13-39, 48-49, 57-82, 193-219 p.
32. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit Lett*. 2006 Jun;27(8):861–74.
33. Publication ASP. *STATA USER ' S GUIDE*. Version13. College Station: Stata Press; 2013.
34. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 14: Logistic regression. *Crit Care*. 2005 Feb;9(1):112–8.
35. Homers David W., Lemeshow Stanley Jr. SR. *Applied Logistic Regression*. Third Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. 1-46 p.
36. De Vivo A, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Corrado F, D'anna R. Endoglin, PIGF and sFlt-1 as markers for predicting pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008 Jan;87(8):837–42.
37. Mikat B, Gellhaus A, Wagner N, Birdir C, Kimmig R, Köninger A. Early detection of maternal risk for preeclampsia. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012 Jan;2012:172808.
38. Steinberg G, Khankin E V., Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res*. 2009;123:S93–9.
39. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dällenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, et al. Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:70.
40. Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Apr;190(4):1128–34.
41. Peña D. *Análisis de Datos Multivariantes*. McGraw Hill Interamericana de España; 2002. 137-171 p.
42. Gabiati J. *Componenetes Principales* [Internet]. Santiago, Chile. 2012 [cited 2015 Sep 4].
43. Cavada G. Tamaño de muestra para estudios diagnósticos. *Rev chil endocrinol diabetes*. 2013;6:4.
44. Camacho-sandoval J. Tamaño de muestra en estudios clínicos. *Acta med costarric*. 2008;50(1):20–1.
45. Camacho-sandoval J. Potencia estadística en el diseño de estudios clínicos. *Acta med costarric*. 2007;49(4):203–4.

46. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*. 1994 Mar 2;271(9):703–7.
47. Hulley SB, Cumming SR. *Designing Clinical Research: An Epidemiologic Approach*. Collins N, editor. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1998. 146-150 p.
48. Yi Z-S, Zhou S-Y, Meng F-Y, Feng R, Liu Q-F, Lin R. [Detection of platelet activation by flow cytometry in patients with pre-eclampsia]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao [Internet]*. 2003 Oct [cited 2017 Mar 8];23(10):1095–6.
49. Konijnenberg A, Stokkers EW, van der Post JA, Schaap MC, Boer K, Bleker OP, et al. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol*. 1997 Feb;176(2):461–9.
50. Tannetta DS, Dragovic R a, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One*. 2013 Jan;8(2):e56754.
51. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, 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 Mar;111(5):649–58.
52. Kita N, Mitsushita J. A possible placental factor for preeclampsia: sFlt-1. *Curr Med Chem*. 2008;15(7):711–5.
53. Orozco AF, Jorgez CJ, Ramos-Perez WD, Popek EJ, Yu X, Kozinetz CA, et al. Placental release of distinct DNA-associated micro-particles into maternal circulation: reflective of gestation time and preeclampsia. *Placenta*. 2009 Oct;30(10):891–7.
54. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998 Jun;105(6):632–40.
55. Gordis L. *Epidemiología*. Tercera Ed. Monje V, editor. Barcelona: Elsevier; 2005. 71-94-223 p.
56. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*. 2009 Jan;4(4):e5219.
57. Kumar R, Indrayan A. Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve for Medical Researchers. *INDIAN Pediatr*. 2011;48(17):277–87.

## 10 CAPÍTULO X: ANEXOS

### 10.1 Tablas anexas:

**Tabla 1. Analisis de Componentes principales:**

|                                   |                 |   |               |
|-----------------------------------|-----------------|---|---------------|
| Principal components/correlation  | Number of obs   | = | <b>181</b>    |
|                                   | Number of comp. | = | <b>4</b>      |
|                                   | Trace           | = | <b>4</b>      |
| Rotation: (unrotated = principal) | Rho             | = | <b>1.0000</b> |

| Component | Eigenvalue     | Difference     | Proportion    | Cumulative    |
|-----------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| Comp1     | <b>2.44747</b> | <b>1.50917</b> | <b>0.6119</b> | <b>0.6119</b> |
| Comp2     | <b>.938307</b> | <b>.468235</b> | <b>0.2346</b> | <b>0.8464</b> |
| Comp3     | <b>.470072</b> | <b>.325925</b> | <b>0.1175</b> | <b>0.9640</b> |
| Comp4     | <b>.144147</b> | <b>.</b>       | <b>0.0360</b> | <b>1.0000</b> |

Principal components (eigenvectors)

| Variable | Comp1         | Comp2          | Comp3          | Comp4          | Unexplained |
|----------|---------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
| z_sflt1  | <b>0.5620</b> | <b>-0.4011</b> | <b>-0.0387</b> | <b>-0.7223</b> | <b>0</b>    |
| z_pigf   | <b>0.4385</b> | <b>0.5655</b>  | <b>0.6985</b>  | <b>-0.0102</b> | <b>0</b>    |
| z_plap   | <b>0.5379</b> | <b>-0.4866</b> | <b>0.0663</b>  | <b>0.6852</b>  | <b>0</b>    |
| z_cd63   | <b>0.4500</b> | <b>0.5316</b>  | <b>-0.7115</b> | <b>0.0931</b>  | <b>0</b>    |

**Tabla 2. Regresión Logística:**

$$\ln(\text{Odds}(A)) = a + \beta_1 cp1 + \beta_2 cp2$$

|                                    |               |   |               |
|------------------------------------|---------------|---|---------------|
| Logistic regression                | Number of obs | = | <b>181</b>    |
|                                    | LR chi2(2)    | = | <b>64.47</b>  |
|                                    | Prob > chi2   | = | <b>0.0000</b> |
| Log likelihood = <b>-6.4410407</b> | Pseudo R2     | = | <b>0.8335</b> |

| dx    | Coef.            | Std. Err.       | z            | P> z         | [95% Conf. Interval]       |
|-------|------------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------------|
| cp1   | <b>-.1403478</b> | <b>.6143829</b> | <b>-0.23</b> | <b>0.819</b> | <b>-1.344516 1.063821</b>  |
| cp2   | <b>-8.90237</b>  | <b>3.31031</b>  | <b>-2.69</b> | <b>0.007</b> | <b>-15.39046 -2.414281</b> |
| _cons | <b>-9.970433</b> | <b>3.351854</b> | <b>-2.97</b> | <b>0.003</b> | <b>-16.53995 -3.40092</b>  |

**Tabla 3. Estimación Componente Principal 1 (CP1):**

$$CP_1 = \alpha + \beta_1 SFLT1 + \beta_2 PIGF + \beta_3 PLAP + \beta_4 CD63$$

. regress cp1 sflt1pgml pigfpgml plappgml cd63particles

| Source   | SS         | df  | MS         | Number of obs | = | 181    |
|----------|------------|-----|------------|---------------|---|--------|
| Model    | 440.545153 | 4   | 110.136288 | F(4, 176)     | = | .      |
| Residual | 0          | 176 | 0          | Prob > F      | = | .      |
| Total    | 440.545153 | 180 | 2.44747307 | R-squared     | = | 1.0000 |
|          |            |     |            | Adj R-squared | = | 1.0000 |
|          |            |     |            | Root MSE      | = | 0      |

| cp1           | Coef.     | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] |
|---------------|-----------|-----------|---|------|----------------------|
| sflt1pgml     | .0215347  | .         | . | .    | .                    |
| pigfpgml      | .0208033  | .         | . | .    | .                    |
| plappgml      | .0252214  | .         | . | .    | .                    |
| cd63particles | 6.51e-11  | .         | . | .    | .                    |
| _cons         | -5.881185 | .         | . | .    | .                    |

**Tabla 4. Estimación Componente Principal 2:**

$$CP_2 = \alpha + \beta_1 SFLT1 + \beta_2 PIGF + \beta_3 PLAP + \beta_4 CD63$$

. regress cp2 sflt1pgml pigfpgml plappgml cd63particles

| Source   | SS         | df  | MS         | Number of obs | = | 181    |
|----------|------------|-----|------------|---------------|---|--------|
| Model    | 168.895324 | 4   | 42.2238311 | F(4, 176)     | = | .      |
| Residual | 0          | 176 | 0          | Prob > F      | = | .      |
| Total    | 168.895324 | 180 | .938307357 | R-squared     | = | 1.0000 |
|          |            |     |            | Adj R-squared | = | 1.0000 |
|          |            |     |            | Root MSE      | = | 0      |

| cp2           | Coef.     | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] |
|---------------|-----------|-----------|---|------|----------------------|
| sflt1pgml     | -.0153685 | .         | . | .    | .                    |
| pigfpgml      | .0268266  | .         | . | .    | .                    |
| plappgml      | -.0228182 | .         | . | .    | .                    |
| cd63particles | 7.69e-11  | .         | . | .    | .                    |
| _cons         | 2.529253  | .         | . | .    | .                    |



**Tabla 5. Regresión Logística (sflt-1):**

$$\ln(\text{Odds}(A)) = a + \beta_1 \text{SFLT1}$$

|                                    |               |   |               |
|------------------------------------|---------------|---|---------------|
| Logistic regression                | Number of obs | = | <b>181</b>    |
|                                    | LR chi2(1)    | = | <b>18.16</b>  |
|                                    | Prob > chi2   | = | <b>0.0000</b> |
| Log likelihood = <b>-29.597429</b> | Pseudo R2     | = | <b>0.2348</b> |

| dx        | Coef.            | Std. Err.       | z            | P> z         | [95% Conf. Interval] |                  |
|-----------|------------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------|------------------|
| sflt1pgml | <b>.048145</b>   | <b>.0156166</b> | <b>3.08</b>  | <b>0.002</b> | <b>.017537</b>       | <b>.078753</b>   |
| _cons     | <b>-7.382061</b> | <b>1.596449</b> | <b>-4.62</b> | <b>0.000</b> | <b>-10.51104</b>     | <b>-4.253078</b> |

**Tabla 6. Regresión Logística (PIGF):**

$$\ln(\text{Odds}(A)) = a + \beta_1 \text{PIGF}$$

|                                    |               |   |               |
|------------------------------------|---------------|---|---------------|
| Logistic regression                | Number of obs | = | <b>181</b>    |
|                                    | LR chi2(1)    | = | <b>1.11</b>   |
|                                    | Prob > chi2   | = | <b>0.2920</b> |
| Log likelihood = <b>-38.122378</b> | Pseudo R2     | = | <b>0.0144</b> |

| dx       | Coef.            | Std. Err.       | z            | P> z         | [95% Conf. Interval] |                  |
|----------|------------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------|------------------|
| pigfpgml | <b>-.0176184</b> | <b>.0174528</b> | <b>-1.01</b> | <b>0.313</b> | <b>-.0518252</b>     | <b>.0165885</b>  |
| _cons    | <b>-2.364053</b> | <b>.5304298</b> | <b>-4.46</b> | <b>0.000</b> | <b>-3.403676</b>     | <b>-1.324429</b> |

**Tabla 7. Regresión Logística (PLAP):**

$$\ln(\text{Odds}(A)) = a + \beta_1 \text{PLAP}$$

|                                    |               |   |               |
|------------------------------------|---------------|---|---------------|
| Logistic regression                | Number of obs | = | <b>181</b>    |
|                                    | LR chi2(1)    | = | <b>37.93</b>  |
|                                    | Prob > chi2   | = | <b>0.0000</b> |
| Log likelihood = <b>-19.710665</b> | Pseudo R2     | = | <b>0.4904</b> |

| dx       | Coef.           | Std. Err.       | z            | P> z         | [95% Conf. Interval] |                 |
|----------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------|-----------------|
| plappgml | <b>.1369914</b> | <b>.045095</b>  | <b>3.04</b>  | <b>0.002</b> | <b>.0486069</b>      | <b>.2253759</b> |
| _cons    | <b>-20.3016</b> | <b>5.887011</b> | <b>-3.45</b> | <b>0.001</b> | <b>-31.83993</b>     | <b>-8.76327</b> |

**Tabla 8. Regresión Logística (CD63):**

$$\ln(\text{Odds}(A)) = a + \beta_1 CD63$$

|                                    |               |   |               |
|------------------------------------|---------------|---|---------------|
| Logistic regression                | Number of obs | = | <b>181</b>    |
|                                    | LR chi2(0)    | = | <b>13.92</b>  |
|                                    | Prob > chi2   | = | <b>.</b>      |
| Log likelihood = <b>-31.716787</b> | Pseudo R2     | = | <b>0.1800</b> |

| dx            | Coef.            | Std. Err.       | z            | P> z         | [95% Conf. Interval] |                  |
|---------------|------------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------|------------------|
| cd63particles | <b>-3.48e-10</b> | <b>1.42e-10</b> | <b>-2.46</b> | <b>0.014</b> | <b>-6.26e-10</b>     | <b>-7.02e-11</b> |
| _cons         | <b>-1.495678</b> | <b>.4297125</b> | <b>-3.48</b> | <b>0.001</b> | <b>-2.337899</b>     | <b>-.6534572</b> |

**Tabla 9. Comparacion curvas ROC:**

```
. roccomp dx p_sflt1 p_pigf p_plap p_cd63 p_cp
```

|                | Obs        | ROC Area      | Std. Err.     | —Asymptotic Normal—<br>[95% Conf. Interval] |                |
|----------------|------------|---------------|---------------|---------------------------------------------|----------------|
| <b>p_sflt1</b> | <b>181</b> | <b>0.7784</b> | <b>0.0787</b> | <b>0.62416</b>                              | <b>0.93256</b> |
| <b>p_pigf</b>  | <b>181</b> | <b>0.5997</b> | <b>0.0964</b> | <b>0.41075</b>                              | <b>0.78866</b> |
| <b>p_plap</b>  | <b>181</b> | <b>0.9251</b> | <b>0.0399</b> | <b>0.84700</b>                              | <b>1.00000</b> |
| <b>p_cd63</b>  | <b>181</b> | <b>0.7956</b> | <b>0.0412</b> | <b>0.71487</b>                              | <b>0.87636</b> |
| <b>p_cp</b>    | <b>181</b> | <b>0.9918</b> | <b>0.0085</b> | <b>0.97525</b>                              | <b>1.00000</b> |

Ho: area(p\_sflt1) = area(p\_pigf) = area(p\_plap) = area(p\_cd63) = area(p\_cp)  
 chi2(4) = **98.17** Prob>chi2 = **0.0000**

## 10.2 Carta Consentimiento Informado paciente embarazada

### Maternidad Complejo Asistencial Dr. Sótero del Río



### **Nombre del Estudio: "BANCO DE INFORMACIÓN EN MUJERES EMBARAZADAS DE LA MATERNIDAD DEL CASR"**

#### **INTRODUCCIÓN:**

Queremos invitarla a participar en un estudio de investigación. Por favor, lea atentamente la descripción del proyecto antes de decidir tomar parte de nuestro estudio. Usted puede tomarse todo el tiempo que necesite para tomar su decisión. Antes de tomar esta decisión, siéntase libre de conversar con quien quiera. Si tiene cualquier duda sobre el estudio, sus potenciales riesgos y beneficios puede consultar a su médico o a alguno de los miembros del staff del estudio. Le recordamos que su participación en este estudio es absolutamente **voluntaria**.

#### **OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:**

Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque está y/o necesita ser ingresada a la Maternidad de CASR para el manejo de su embarazo y parto. Desde la entrada en vigencia de la Ley de Derechos y Deberes de los pacientes es necesario solicitar su inclusión en este estudio para tener acceso a data referente a su ingreso a la Maternidad.

#### **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

- Este es un estudio "observacional", lo que significa que Ud. recibirá sus tratamientos en forma normal, sin que se le practique ningún examen adicional.
- Estamos realizando este estudio porque queremos entender mejor por qué ocurren algunas enfermedades del embarazo y del parto. Al conocer los mecanismos que producen las enfermedades, es posible ofrecer diagnósticos más precisos y mejores tratamientos. Para ello, simplemente registraremos la evolución de su embarazo y de su recién nacido. También queremos almacenar una porción de las muestras obtenidas como parte de su tratamiento (por ejemplo: sangre, orina y líquido amniótico). Esto nos permitirá analizar su muestra junto con la de otras pacientes y así obtener resultados más confiables.
- Parte de este estudio consiste en tomar y almacenar muestras para investigaciones futuras. Quisiéramos almacenar indefinidamente una porción que no se use de las muestras que se le tomarán como parte de su cuidado durante su hospitalización (por ejemplo: sangre, orina y líquido amniótico) y de las muestras tomadas para este estudio, según lo que se describe más adelante en la sección "Procedimientos". Nos proponemos estudiar genes, proteínas y otras sustancias para encontrar diferencias entre los embarazos normales y aquellos con complicaciones (leer sección "Anexo").

Todos los otros aspectos de su control de embarazo no presentarán ningún cambio. Usted tendrá el mismo número de visitas a su obstetra como lo planeado normalmente.

## **PROCEDIMIENTOS:**

Si Ud. decide participar en este estudio, se le ofrecerán los siguientes exámenes:

1. Luego de su ingreso, su doctor puede indicarle algunos exámenes de sangre. Si Ud. acepta participar en este estudio, además se obtendrán y guardarán 25 cc de sangre (cinco cucharaditas de té). Si se requieren nuevos exámenes de sangre, se obtendrán y guardarán 10 cc (2 cucharaditas de té) para los fines de este estudio. La cantidad máxima que se obtendrá para las participantes de este protocolo de investigación no excederá 7 ml/kg (1/2 cucharada de sopa por kg de peso) en un periodo de seis semanas para los menores de edad que pesen menos de 64 kg o 450 ml en un periodo de seis semanas para los adultos.
2. Tomaremos una muestra de secreciones de su cavidad oral (boca), la que será guardada y nos permitirá buscar diversos factores (ej: moleculares, genéticos y otros) que estén asociados con complicaciones del embarazo.
3. Si al ingresar al hospital se le toma una muestra de orina, se obtendrán y guardarán 10 a 20 cc adicionales (2 a 4 cucharaditas de té) para los fines de este estudio.
4. Como parte de su examen de ingreso al hospital, puede ser necesario realizar un examen visual de la vagina y el cuello del útero. Tomaremos 3 muestras de secreción vaginal para un análisis posterior.
5. Durante su embarazo su doctor puede necesitar hacer un examen llamado amniocentesis para obtener una muestra del líquido que rodea a la guagua (líquido amniótico). Esto permite saber si el bebé tiene los pulmones maduros o si tiene una infección. Si le realizan este examen, obtendremos 20 cc adicionales de líquido amniótico (4 cucharaditas de té) para los fines de este estudio.
6. Si su doctor necesita romper las membranas (bolsa de aguas) antes del parto o en caso que su guagua nazca por cesárea, obtendremos líquido amniótico para los fines de este estudio. Normalmente este líquido se elimina.
7. Asimismo, su doctor puede necesitar hacer un examen llamado cordocentesis para obtener una pequeña muestra de sangre desde el cordón umbilical. Si esto ocurre, obtendremos 2 cc (la mitad de una cucharadita de té) para los fines de este estudio.
8. Si le hacemos una ecografía, queremos que nos autorice a grabar y guardar el examen para después analizarlo.
9. Si se le realiza una cesárea y la anestesia es del tipo raquídea, solicitaremos una muestra del líquido cerebroespinal (5 cc, 1 cucharada de té). Usualmente no se recolecta el líquido cerebroespinal que cae al administrar la anestesia.
10. Después que su guagua haya nacido y se haya cortado el cordón umbilical, tomaremos muestras de sangre del cordón que queda colgando de la placenta (20 a 40 cc, 2 a 4 cucharadas soperas). La placenta también la guardaremos para examinarla. Tanto la sangre del cordón umbilical como la placenta usualmente se eliminan.
11. Cuando nacen las guaguas normalmente tienen secreciones en la garganta y el estómago, las que generalmente son aspiradas y eliminadas. Nos gustaría guardar estas muestras para estudiarlas.
12. Si durante el primer día de vida de su guagua necesita asistencia mecánica para respirar (ventilador mecánico), nos gustaría poder obtener y guardar las secreciones que provienen de sus pulmones, estas secreciones normalmente son eliminadas.
13. En el caso que su médico determine que es necesario practicarle una histerectomía luego del parto (sacar el útero), nos gustaría obtener muestras del útero para poder examinarlas.
14. En el caso que ocurriera una muerte fetal, nos gustaría obtener muestras de tejidos que no sean utilizadas en la autopsia para fines de este estudio.
15. Con el objeto de conocer cómo evolucionó su embarazo, revisaremos su ficha clínica y la de su guagua. Esta información se conservará en forma confidencial.

Si, doy mi permiso para que la información médica de mi guagua se use en el futuro.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Iniciales de la paciente

### **RIESGOS EN RELACIÓN AL ESTUDIO:**

1. **Sangre materna adicional:** No hay riesgo para Ud. o para su guagua. Hay un riesgo menor de una infección local o de la ocurrencia de un hematoma ("moretón") en el lugar de donde se obtiene la sangre.
2. **Muestra bucal:** No hay riesgo para Ud. recogiendo la secreción del interior de su boca.
3. **Ecografía Doppler y vaginal:** No hay riesgo para la madre o el bebé.
4. **Líquido amniótico adicional:** No hay evidencia que la obtención de una cantidad adicional de líquido cause cualquier daño a su o sus bebés.
5. **Sangre del cordón umbilical y muestra de placenta:** No hay riesgo asociado a la obtención de sangre del cordón o muestras de la placenta después del parto.
6. **Muestras de secreciones del estómago o del pulmón:** No hay riesgo en la obtención de estas muestras, porque generalmente se hace como parte de los cuidados clínicos.
7. **Muestras de tejido:** No hay riesgo en la obtención de estas muestras, ya que la autopsia ya ha sido realizada o la pieza quirúrgica (por ejemplo: el útero) ya ha sido extraída.

### **BENEFICIOS:**

Usted o su hijo(a) pueden no recibir beneficio alguno al entrar en este estudio. Sin embargo, el conocimiento que se obtenga con este proyecto nos ayudará a entender mejor cómo se producen las enfermedades del embarazo. Esto puede resultar en mejores tratamientos para el futuro.

### **ALTERNATIVAS:**

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted puede decidir no participar en este estudio, o entrar en el estudio y retirarse en cualquier momento si cambia de parecer. Esto no afectará en lo absoluto la calidad de sus atenciones de salud.

Si usted decide participar y luego se retira del estudio le pediremos su permiso para continuar recolectando sus datos.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS:**

Los estudios de esta investigación, así como la evaluación patológica descritas en este protocolo que no sean parte de su asistencia médica de rutina, no tienen ningún costo para Ud.

### **En el caso que haya daños por el estudio:**

Si usted se enferma o lesiona como resultado de tomar parte en este estudio recibirá atención en este centro y los costos estarán cubiertos. Al firmar el consentimiento no libera de responsabilidad a los investigadores de este estudio.

### **CONFIDENCIALIDAD:**

Si acepta participar en el estudio, su médico a cargo junto al equipo de investigación se encargarán de recolectar la información correspondiente al estudio. Esta información incluye: nombre, dirección, fecha de nacimiento, reportes médicos nuevos o existentes.

La información obtenida en el estudio será conservada por muchos años, sólo el equipo del estudio está autorizado para tener acceso a su información. El que esté participando en el estudio quedará registrado en los datos del hospital.

**Resto de la información:**

Alguna información del estudio será enviada fuera del hospital. Esta información será codificada y no llevará su nombre o dirección. Toda la información recogida en este estudio será confidencial. Si usted decide retirarse del estudio se utilizará la información recolectada hasta ese momento.

**DERECHOS COMO PACIENTE EN ESTUDIO:**

Si usted tiene cualquier pregunta en relación a este estudio, por favor consulte con el personal médico que la atiende. También puede conversar con el Dr. Juan Pedro Kusanovic (Investigador local) llamando al 25762189 ó al 9-2502017. Usted puede pedir una copia de este consentimiento si lo desea. Si tiene consultas en relación a sus derechos como paciente en estudio, puede llamar al Sr. Patricio Michaud o a la Sra. Edith Mora, del Comité de Ética del Complejo Asistencial Dr. Sótero del Río, al número 25762407.

## CONSENTIMIENTO

Me han explicado el objetivo y características del estudio y todas mis preguntas han sido contestadas. Sé que puedo renunciar en cualquier momento. Autorizo mi participación en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Nombre del participante  
Fecha

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
Firma

Mi firma significa que le he explicado todo sobre el estudio a la paciente y contestado todas sus preguntas.

\_\_\_\_\_  
Nombre de la persona  
Que obtiene el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

¿Recibió asistencia la participante durante el proceso de consentimiento?

SÍ  NO

En caso **AFIRMATIVO**, marque la casilla correspondiente y complete el espacio destinado a la firma a continuación:

El formulario de consentimiento fue leído a la participante. La persona que firma a continuación certifica que el estudio que figura en este formulario se explicó con exactitud, y que se respondieron sus preguntas.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo  
Fecha

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Parentesco o relación con la participante

\_\_\_\_\_  
Firma Director CASR

\_\_\_\_\_  
Fecha

**NOMBRE DEL ESTUDIO: "ESTABLECIMIENTO DE UNA BANCO DE  
INFORMACIÓN  
Y MUESTRAS BIOLÓGICAS PERINATALES"**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE EMBARAZADA**

**ANEXO ESTUDIOS FUTUROS**

Algunas de las muestras que tomemos las usaremos de inmediato. Guardaremos parte de las muestras que no usemos para estudios futuros. Es posible que en el futuro estas muestras se puedan usar en la aplicación de nuevos métodos de estudio de los genes (ADN), las proteínas y otras sustancias, para ver si se asocian con parto prematuro, rotura prematura de membranas, desprendimiento de placenta, preeclampsia, niños pequeños para la edad gestacional, infección neonatal, parálisis cerebral, enfermedad pulmonar crónica y otras complicaciones del embarazo. Quisiéramos su permiso para utilizar estas muestras para identificar cambios en los genes, lo que nos podría entregar conocimiento sobre estas enfermedades y así, eventualmente, poder mejorar los tratamientos. Sus muestras serán utilizadas exclusivamente para investigar diferencias entre los embarazos normales y las complicaciones durante la gestación.

Sus muestras serán codificadas y no serán identificadas por su nombre u otros identificadores personales. Los congeladores donde se almacenan sus muestras están situados en áreas seguras. Solamente las personas relacionadas con esta investigación tendrán acceso a las muestras. Su información médica será almacenada en lugares seguros y de acceso restringido o bajo una contraseña en un computador.

Es posible, (aunque improbable), que obtengamos información inesperada sobre su salud o sus características genéticas. Los estudios genéticos pueden descubrir relaciones inesperadas de la familia. Por ejemplo, es posible que sepamos que un miembro de la familia no es el hijo biológico de los padres con quienes vive (como en el caso de la adopción). No proporcionaremos este tipo de información a ningún miembro de la familia o a su médico. Sin embargo, es posible que hagamos excepciones bajo circunstancias extraordinarias, como que esta información realmente sea necesaria para el cuidado médico de las personas implicadas. Si estamos convencidos que esto es necesario, proporcionaremos la información al médico que atiende al paciente.

- Entiendo que las muestras obtenidas para este protocolo de investigación serán utilizadas en estudios futuros que pretenden entender las diferencias entre los embarazos normales y aquellos con complicaciones.
- Entiendo que posteriormente no se me entregará información sobre la naturaleza de los estudios futuros, pero que estos estudios estarán orientados exclusivamente a encontrar diferencias entre los embarazos normales y aquellos con complicaciones.

- Ya que la mayoría de estos estudios no tendrán ninguna importancia para mi cuidado médico o el de mi hijo(a), entiendo que no seré contactado(a) para entregarme información sobre los resultados de estos estudios.
  - Entiendo que si algún resultado del estudio tuviera alguna importancia médica para mí o para mi hijo(a) se intentará entrar en contacto con el o los médicos que me atendieron, o conmigo si es que existiera información para que me contacten utilizando los archivos del Centro de Investigación e Innovación en Medicina Materno – Fetal (CIMAF) o los archivos del Hospital Dr. Sótero del Río. Ud. puede llamar al investigador principal de este estudio, Dr. Juan Pedro Kusanovic al teléfono 25762189, para poner al día su información de contacto (dirección y número de teléfono).
- Si Ud. **NO** desea que sus muestras sean utilizadas en el futuro, esto no excluye que sus muestras se utilicen de inmediato. En la eventualidad que sea necesario utilizar sus muestras en el futuro, previamente solicitaremos una autorización al Comité de Ética del Hospital Dr. Sótero del Río.

## CONSENTIMIENTO

Me han explicado el objetivo y características del estudio y todas mis preguntas han sido contestadas. Se que puedo renunciar en cualquier momento.

**SI** Doy mi permiso para que se usen las muestras en estudios futuros, como se mencionó anteriormente.

\_\_\_\_\_

Iniciales de la paciente

\_\_\_\_\_

Fecha

**NO** No doy mi permiso para que se usen las muestras en estudios futuros, como se mencionó anteriormente.

\_\_\_\_\_

Iniciales de la paciente

\_\_\_\_\_

Fecha

### **RIESGOS**

Investigaciones futuras: En el futuro, las muestras pueden ser examinadas para estudiar los genes (ADN), proteínas y otras sustancias. Es posible (aunque improbable), que obtengamos información inesperada sobre su salud o sus características genéticas.

\_\_\_\_\_

Firma  
Paciente

\_\_\_\_\_

Firma  
Padre/Madre/Tutor legal

\_\_\_\_\_

Firma  
Médico/Matrona/Investigador

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Firma Director CASR



\_\_\_\_\_  
Fecha

|                               |             |
|-------------------------------|-------------|
| IDENTIFICACION DE LA PACIENTE | N° Estudio: |
| Nombre y Apellidos:           | RUT:        |

## 10.3 Carta de Colaboración



**UQ Centre for Clinical Research**  
The University of Queensland Building 71/913  
RBWH Campus Herston, Qld 4029 Australia  
Telephone 07 3346 6075  
International +61 7 3346 6075  
Facsimile +61 7 3348 5509  
Email [g.rice@uq.edu.au](mailto:g.rice@uq.edu.au)  
[www.uqccr.uq.edu.au](http://www.uqccr.uq.edu.au)

### LETTER OF COLLABORATION

*Re: Project CORFO L2 "Development of a kit for the prediction of PE based on exosomes and inflammatory markers present in oral fluids"*

28 July 2014

Dear Dr Chaparro

As Acting Director of the University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), I write to confirm our support of the CORFO L2 project "*Development of a kit for the prediction of PE based on exosomes and inflammatory markers present in oral fluids*" and our commitment as a joint research collaborator.

The UQCCR is a state of the art translational research facility situated adjacent to Australia's largest public hospital the Royal Brisbane and Women's Hospital, Brisbane, Australia. It was designed specifically to bridge the gap between academic research, industry and the evaluation and implementation of clinical outcomes. Recently, it also established a Centre for Clinical Diagnostics (CCD) to develop, evaluate and deliver new in vitro diagnostics (IVDs) within a National Association of Testing Association (NATA) accredited research and development environment. It is ISO17025 (R&D) NATA accredited, compliant with ISO13485 (Medical Devices) and Good Clinical Practice (GCP) and conforms to FDA guidelines for electronic record handling (21 CFR Part 11). The CCD together with a dedicated outpatient floor for the conduct of clinical trials establishes UQCCR as a unique clinical research, development and evaluation facility in Australia that delivers regulatory ready data to achieve higher R&D efficiencies and return on investment, and reduced product time-to-market. In addition, it has a unique role in the training of staff and students to international industry standards.

In relation to this project, we have a well-developed exosome research program already established. We have developed best-practice methods for the isolation and characterisation of exosomes. Our laboratory has a proteomic and lipidomics facility, equipped with the latest mass-spectrometers (AbSciex 5500, 5600 and 5800 and Shimadzu 8060), next generation sequencing (Illumina HiSeq 2000 and MiSeq platforms), multiplex solution array platform (BioPlex 200) and real time cell imaging (Incucyte) and nanoparticle tracking (Nanocyte) that allow comprehensive characterisation of exosomal content and function. As such, our laboratory is ideally suited to conduct and provide support for this Corfo project.

In addition, we have a long-standing research track record in complications of pregnancy, including preeclampsia, inflammation, the identification of biomarkers and the development of *in vitro* diagnostic tests. We are able to allocate the necessary research time, staff and infrastructure to successfully complete this project.

Yours faithfully,

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval.

Professor Gregory Rice  
PhD MHA Acting Director, UQCCR