



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA
CLÍNICA



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Utilidad de los marcadores biológicos relacionados con el equilibrio angiogénico/antiangiogénico en la predicción del diagnóstico de la preeclampsia

Alumno: Clara Jiménez García

R3 Análisis Clínicos

Hospital General Universitario de Alicante

Tutor: Emilio Flores Pardo

Curso: 2019-2020

Resumen

Introducción: La preeclampsia (PE) es un trastorno hipertensivo del embarazo definido como la aparición de hipertensión y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación. Afecta en torno el 2 y 8% de los embarazos a nivel mundial y presenta una elevada morbimortalidad obstétrica y perinatal.

Objetivos: El objetivo principal fue determinar la fuerza de asociación de PE con los marcadores biológicos relacionados con el equilibrio angiogénico/antiangiogénico en la población obstétrica que acudió al Hospital de Alicante con algún signo clínico de sospecha de PE y determinar cuál era la utilidad de cada marcador así como valorar cuál era el marcador con valores de rendimientos diagnósticos más óptimos.

Material y métodos: Se realizó un estudio observacional, analítico, retrospectivo tipo casos y controles, en el Hospital General Universitario de Alicante en el que se incluyeron a 209 gestantes que acudieron al servicio de urgencias obstétricas o a consultas externas de ginecología por sospecha de PE, entre enero de 2018 a diciembre de 2019. El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas informáticos SPSS y MedCalc.

Resultados: Se analizó el rendimiento de los distintos marcadores para el diagnóstico de PE mediante curvas ROC obteniéndose que el biomarcador con mejor AUC fue el ratio sFlt-1/PIGF (AUC=0,890). En cuanto al rendimiento de las magnitudes bioquímicas para el diagnóstico de la PE en la población total del estudio se obtuvieron puntos de corte óptimos para cada uno de ellos seleccionados de acuerdo al Índice de Youden.

Para un punto de corte del cociente sFlt-1/PIGF de 42, se obtuvieron valores de sensibilidad de 90,59%, especificidad de 78,23% y valor predictivo negativo de 99,8%. Además, mediante un análisis de regresión lineal una vez obtenido el punto de corte óptimo para el marcador con mayor rendimiento para el diagnóstico de PE se calculó la odds ratio para medir así la fuerza de asociación siendo esta superior a 1.

Conclusiones: Los biomarcadores modificadores de la angiogénesis (sFlt-1, PIGF), han mostrado utilidad diagnóstica para diferenciar las gestantes con PE de las que no, siendo el cociente sFlt-1/PIGF el biomarcador con mejor rendimiento para el diagnóstico de PE con una sensibilidad de 90,59 y un valor predictivo negativo de 99,8 para un punto de corte de 42,12.

Palabras clave: Preeclampsia; factor de crecimiento placentario; receptor soluble tipo tirosincinasa 1

Abstract

Introduction: Preeclampsia (PE) is a hypertensive disorder of pregnancy defined as the appearance of hypertension and proteinuria from the 20th week of gestation. It affects around 2 and 8% of pregnancies worldwide and presents a high obstetric and perinatal morbidity and mortality.

Objectives: The main objective was to determine the strength of the association of PE with the biological markers related to the angiogenic / antiangiogenic balance in the obstetric population that came to the Hospital de Alicante with some clinical sign of suspected PE and to determine the usefulness of each marker as well as assessing which was the marker with the most optimal diagnostic yield values.

Material and methods: An observational, analytical, retrospective case-control type study was carried out at the General University Hospital of Alicante, which included 209 pregnant women who attended the obstetric emergency department or outpatient gynecology consultations for suspected PE, between January 2018 to December 2019. Statistical analysis of the data was performed with the SPSS and MedCalc software.

Results: The performance of the different markers for the diagnosis of PE was analyzed using ROC curves, obtaining that the biomarker with the best AUC was the ratio sFlt-1 / PlGF (AUC = 0.890). Regarding the performance of the biochemical magnitudes for the diagnosis of PE in the total study population, optimal cut-off points were obtained for each of them selected according to the Youden Index.

For a sFlt-1 / PlGF ratio cut-off point of 42, sensitivity values of 90.59%, specificity of 78.23% and negative predictive value of 99.8% were obtained. Furthermore, by means of a linear regression analysis once the optimal cut-off point for the marker with the highest performance for the diagnosis of PE was obtained, the odds ratio was calculated to measure the association strength, being this greater than 1.

Conclusions: Angiogenesis modifying biomarkers (sFlt-1, PlGF) have shown diagnostic utility in differentiating pregnant women with PE from those that do not, with the sFlt-1 / PlGF ratio being the biomarker with the best performance for diagnosing PE with a sensitivity of 90.59 and a negative predictive value of 99.8 for a cut-off point of 42.12.

Key words: Pre-eclampsia; placental growth factor; soluble fms-like tyrosine kinase-1

ÍNDICE

1. Introducción	5
Hipótesis.....	7
2. Objetivos	7
Objetivo principal.....	7
Objetivos secundarios.....	7
3. Material y métodos.....	8
Diseño del estudio	8
Criterios de inclusión.....	8
Criterios de exclusión.....	8
Población de estudio.....	8
Variables a estudio.....	8
Métodos analíticos.....	9
Análisis estadístico de los datos.....	9
Ética.....	10
4. Resultados	10
Muestra.....	10
Características de la población y resultados obtenidos.....	11
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones	20
7. Bibliografía	20

1. Introducción

La preeclampsia (PE) es una de las enfermedades obstétricas con mayor importancia clínica, considerada la 2ª causa de mortalidad materna después de la sepsis. Esto viene motivado tanto por su frecuencia afectando en torno el 2 y 8% de los embarazos a nivel mundial; como por su relevancia clínica; ya que se trata de una de las causas de morbilidad obstétrica y perinatal más importante (1). En nuestro país, se estima una incidencia de PE entorno al 1,4% de los embarazos (2), con un aumento de la frecuencia relativa de PE grave respecto a estudios anteriores.

Actualmente la PE se define como la aparición de hipertensión de novo en la segunda mitad del embarazo (más allá de la semana 20 de gestación) acompañada de proteinuria (ratio proteína/creatinina en la orina >30 mg/mmol (0,3mg/mg) o >300 mg/día o al menos 1g/L (2+) en las tiras reactivas de orina), siendo estas dos de las manifestaciones clínicas más frecuentes (3). Sin embargo, la PE es un trastorno multiorgánico con un amplio espectro clínico que puede cursar con otras disfunciones orgánicas maternas, tales como insuficiencia renal, alteraciones hepáticas, complicaciones neurológicas, complicaciones hematológicas (trombocitopenia, hemólisis) y disfunciones útero-placentarias (restricción del crecimiento fetal).

En relación al momento de su debut, consideramos a su vez otros dos tipos de PE. Hablamos de PE precoz, cuando se establece su debut antes de la semana 34, y suele ir asociada a afectación fetal (CIR), representando el 15 % del total de las PE. No existen límites precisos, pero sí existe una mayor severidad clínica en estas PE precoces, mientras que las formas tardías, aunque frecuentes son generalmente más leves y usualmente no se asocian a retraso de crecimiento intrauterino. Las placentas de gestaciones menores de 34 semanas son significativamente diferentes en sus hallazgos vasculares de las de edades gestacionales posteriores (4). Cuando el debut clínico de la PE sucede en edad gestacional superior a 34 semanas, se denomina PE tardía, y aparecen unas características que podrían sugerir encontrarnos ante una entidad diferente. Suele tratarse de PE más leves clínicamente, sin tanto compromiso placentario, pero con más predisposición materna. En cualquier caso, la separación entre PE precoz y tardía, aunque pedagógicamente útil no puede hacernos minusvalorar la relevancia de esta última. No olvidemos que el 20% de los síndromes HELLP y el 55% del total de las eclampsias aparecen en embarazos a término (5).

Existen numerosos factores maternos que predisponen a padecer este síndrome: nuliparidad, PE en embarazo anterior, edad <20 años o ≥ 40 años, índice de masa corporal ≥ 35 kg/m², etnia afroamericana, embarazo por técnicas de reproducción asistida, historia familiar de PE en madre o hermana, embarazo múltiple y algunas enfermedades previas (hipertensión arterial, enfermedad renal, diabetes o síndrome antifosfolípido) (6). Además de estos factores, existe otro grupo de factores placentarios, implicados en el desarrollo de PE, que tiene su base en la disminución de la perfusión placentaria por causas inmunológicas, genéticas de origen paterno, factores ambientales y factores nutricionales (7).

En cuanto a los mecanismos fisiopatológicos por los que se produce la enfermedad, hay que decir que estos no se conocen aun en su totalidad. En la última década, la hipótesis del desequilibrio entre factores

angiogénicos y antiangiogénicos ha ganado preponderancia como mecanismo más probable de la patogénesis de la PE. Parece que la PE se debe a la liberación placentaria de factores angiogénicos que inducen una disfunción endotelial que desencadenan un estado de marcada vasoconstricción, cuando no se consigue la adecuada vasodilatación propia del embarazo normal (8).

En mujeres con PE están alteradas las concentraciones séricas del PIGF (factor de crecimiento placentario) y sFlt-1 (receptor soluble tipo tirosinasa 1), también conocido como receptor 1 de VEGF (factor de crecimiento vascular). Por lo que las concentraciones circulantes de PIGF y sFlt-1 permiten diferenciar un embarazo normal de otro con PE incluso antes de que aparezcan los síntomas clínicos. En gestaciones normales, el factor proangiogénico PIGF aumenta durante los primeros dos trimestres, alcanzando las concentraciones más elevadas alrededor de las semanas 29-32 de gestación, para posteriormente reducirse a medida que el embarazo alcanza su término. Por el contrario, las concentraciones del factor antiangiogénico sFlt-1, permanecen más o menos estables hasta la semana 29-32 y luego se incrementan rápidamente hasta el parto (9).

En las mujeres que desarrollan PE, se observan concentraciones de PIGF significativamente más bajas desde el final del primer trimestre que en un embarazo normal. Las concentraciones de sFlt-1 en gestantes que desarrollan PE se elevan más tardíamente y de forma menos pronunciada (10). El cociente sFlt-1/PIGF se eleva en PE, alcanzando la máxima diferencia entre las semanas 26 y 31 (11)(12). Después, el cociente tiende a converger en los embarazos normales y con PE, lo que puede limitar su utilidad clínica (13)(14).

El cociente sFlt-1/PIGF ha demostrado tener un mayor valor predictivo para la PE que la medición de cada parámetro por separado (15). Además, parece constituir una herramienta fiable para distinguir entre diferentes tipos de hipertensión durante el embarazo. Adicionalmente, el cociente sFlt-1/PIGF tiene el potencial de convertirse en un parámetro pronóstico de la PE y de eventuales complicaciones de la madre y el feto relacionadas con esta enfermedad (16)(17). Además se ha visto su utilidad en la estratificación del riesgo y en el manejo de la PE (18).

Además, la evaluación de la gravedad del cuadro clínico es muy importante ya que la PE puede complicarse rápidamente a un síndrome de HELLP (del inglés H: hemólisis; EL: enzimas hepáticas elevadas; LP: bajo recuento plaquetario) o a una eclampsia, que se caracteriza por la presencia de convulsiones tónico-clónicas, no atribuibles a otras causas, durante el embarazo o el posparto reciente. Es, por tanto, importante tanto el diagnóstico precoz como el estrecho seguimiento de las embarazadas con PE. En algunos casos, el seguimiento se tiene que llevar a cabo tras el parto, ya que un porcentaje elevado de mujeres con PE presentan un alto riesgo de desarrollar otras complicaciones a largo plazo, como hipertensión crónica, diabetes y procesos asociados a enfermedad cardiovascular (19).

Dado que la información aportada por el laboratorio puede ser clave para la clasificación y seguimiento de estas pacientes, en los últimos años, diversos grupos de investigación han dedicado gran esfuerzo para aportar evidencia científica acerca de potenciales marcadores bioquímicos que permitan predecir y/o llevar a cabo un diagnóstico precoz de la PE (18).

Hipótesis

Los marcadores biológicos relacionados con el equilibrio angiogénico/antiangiogénico son de utilidad en la predicción del diagnóstico de PE. Durante el desarrollo de la PE se produce una disfunción placentaria que da lugar a la producción alterada de los factores reguladores de la angiogénesis, como el PIGF y el sFlt-1. Por ello, la determinación de los mismos y del cociente entre ambos (sFlt-1/PIGF) podría ser útil en el diagnóstico de la PE y el pronóstico de complicaciones obstétricas en gestantes que acuden al Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) con sospecha de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la PE precoz y tardía constituyen formas diferentes de enfermedad y sabiendo que los marcadores varían en función de la edad gestacional la aplicación de puntos de corte diferentes en cada caso podría aumentar el rendimiento de los mismos.

2. Objetivos

Objetivo principal

El objetivo principal fue determinar la fuerza de asociación de PE con los marcadores biológicos relacionados con el equilibrio angiogénico/antiangiogénico en la población obstétrica que acudió al Hospital General Universitario de Alicante con algún signo clínico de sospecha de PE.

Objetivos secundarios

- Valorar la asociación de la edad y la semana de gestación con las gestantes que desarrollaron PE y las que no.
- Valorar la asociación de la diabetes, las técnicas de reproducción asistida, la hipertensión crónica y el embarazo gemelar con la PE.
- Valorar la asociación del índice de masa corporal (IMC), la tensión arterial sistólica (TAS) y la tensión arterial diastólica (TAD) con los grupos de estudio (PE versus no PE)
- Analizar las variables con mayor peso independiente a través del análisis multivariante.
- Obtención de posibles puntos de corte de los marcadores de PE y de los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E), así como los coeficientes de probabilidad positivo y negativo mediante curvas de rendimiento diagnóstico.
- Determinar cuál era la utilidad de cada marcador y ver cuál era el marcador con valores de rendimientos diagnósticos más óptimos.

3. Material y métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, analítico, retrospectivo tipo casos y controles, en el Hospital General Universitario de Alicante en el que se incluyeron gestantes que acudieron al servicio de urgencias obstétricas o a consultas externas de ginecología por sospecha de PE, entre enero de 2018 a diciembre de 2019.

Criterios de inclusión

- Gestantes de 18 a 41 años de edad con sospecha de PE.
- Gestantes con un seguimiento completo del embarazo en el Hospital General Universitario de Alicante.
- Gestantes con historia clínica disponible.
- Gestantes a las que se les hubiera realizado los siguientes parámetros de laboratorio: ratio sFlt-1/PIGF, sFlt-1, PIGF, cociente proteínas/creatinina y proteínas en orina.

Criterios de exclusión

- Sospecha de PE sin confirmación mediante análisis de orina.
- Pacientes procedentes de otros hospitales de la provincia sin acceso a datos de la historia clínica.
- Existencia de enfermedad renal crónica.
- Edad gestacional inferior a 20 semanas.

Población de estudio

Se realizó una clasificación de las gestantes en PE y no PE, según los criterios del ISSHP y ACOG (20). Se calculó el tamaño muestral estimando una proporción, obteniéndose que la muestra mínima para realizar el estudio debía estar formada por 69 casos y 69 controles. Para el cálculo de este parámetro se utilizó una población de 300000 con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 3%, siendo la prevalencia de la enfermedad del 1,4%. Finalmente, se seleccionó una mayor muestra incluyendo a todas las gestantes a las que se les realizó el cociente sFlt-1/PIGF entre enero de 2018 a diciembre de 2019.

Variables a estudio

Los principales parámetros bioquímicos y las variables clínicas del estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Variables del estudio.

Variabes	Tipo de variable	Categorías	Unidades
Preeclampsia (Resultado)	Catagórica binaria	NO/SI	
IMC	Cuantitativa		kg/m ²
Diabetes	Catagórica binaria	NO/SI	
FIV	Catagórica binaria	NO/SI	

HTA crónica previa al embarazo	Categorica binaria	NO/SI	
Gemelar	Categorica binaria	NO/SI	
Tensión arterial sistólica (TAS)	Cuantitativa		mmHg
Tensión arterial diastólica (TAD)	Cuantitativa		mmHg
Edad materna	Cuantitativa		Años
Ratio sFlt-1/PIGF	Cuantitativa		
sFlt-1	Cuantitativa		pg/mL
PIGF	Cuantitativa		pg/mL
Cociente PT/creatinina	Cuantitativa		mg/g Cr
PT en orina	Cuantitativa		mg/dL
Semana de gestación	Cuantitativa		Semanas

*PT: proteínas, FIV: fecundación in vitro e IMC: Índice de masa corporal.

La recogida de datos clínicos se realizó consultando las historias clínicas de todas las gestantes en Orion Clinic, programa perteneciente al Sistema Informático Hospitalario de la Comunidad Valenciana. Los datos de laboratorio se obtuvieron mediante el sistema informático del laboratorio (Gestlab).

Métodos analíticos

Los niveles de PIGF y sFlt-1 se determinaron mediante un inmunoensayo de tipo sándwich con detección por electroquimioluminiscencia en un autoanalizador Cobas e411 (Roche Diagnostics®). La creatinina fue determinada mediante una prueba cinética colorimétrica basada en el método de Jaffé y las proteínas en orina mediante turbidimetría, ambas pruebas fueron realizadas en un autoanalizador Cobas e702 (Roche Diagnostics®).

Análisis estadístico de los datos

Para llevar a cabo un adecuado análisis estadístico de la población de estudio, se analizaron las distintas variables de estudio mediante el cálculo de estadísticos descriptivos básicos. Respecto a las variables cualitativas, fueron descritas sus frecuencias absolutas y porcentajes. Para llevar a cabo el estudio de las variables cuantitativas, en primer lugar, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer la normalidad de estas variables.

Las comparaciones entre las variables cualitativas se realizaron mediante el test exacto de Fisher. La asociación entre la variable cualitativa PE con las variables cuantitativas que seguían una distribución normal se realizó con el test t de Student, mientras que con las variables que no seguían una distribución normal mediante el test U de Mann-Whitney.

Finalmente, se elaboraron modelos multivariantes mediante un análisis de regresión logística, tomando como referencia la Odds Ratio (OR) ajustada, con un intervalo de confianza del 95%. Se seleccionaron aquellas variables estadísticamente significativas del análisis univariante realizado previamente.

Además, se elaboraron curvas de rendimiento diagnóstico ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para la obtención de posibles puntos de corte de los marcadores de PE y de los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E), así como los coeficientes de probabilidad positivo y negativo. La utilidad de cada marcador se determinó mediante el valor del área bajo la curva (AUC). En cuanto al rendimiento de las magnitudes bioquímicas para el diagnóstico de la PE en la población total del estudio, se obtuvieron puntos de corte para cada uno de ellos seleccionados de acuerdo al Índice de Youden. Las diferentes AUCs se compararon mediante el test de DeLong et al. Para ello, se utilizó el programa informático MedCalc.

En todos los contrastes de hipótesis realizados con técnicas estadísticas se ha aceptado la existencia de significación estadística para una confianza superior al 95%, admitiendo un valor aleatorio inferior al 5% ($p < 0,05$). El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el programa informático SPSS versión 21.0 (Chicago, Illinois, USA).

Ética

Se solicitó la aprobación de este proyecto por el CEIC del Hospital General Universitario de Alicante. Se entiende que el análisis retrospectivo de datos derivados de la actividad clínica no debe exigir consentimiento, en cuanto que las identificaciones de los médicos y de los pacientes atendidos estén codificadas para asegurar su anonimato. Aun así, considerado por el CEIC, se procedió a solicitar consentimiento por escrito a los ginecólogos del hospital. El código de investigación responsable asignado fue 200424190214.

4. Resultados

Muestra

La población de estudio estaba constituida inicialmente por un total de 239 pacientes que tras aplicar los criterios de exclusión la población de estudio se redujo a 209. Los motivos de exclusión fueron: sospecha de PE sin confirmación mediante análisis de orina (10 casos), pacientes procedentes de otros hospitales de la provincia sin acceso a datos de la historia clínica (14 casos), existencia de enfermedad renal crónica (4 casos) y edad gestacional inferior a 20 semanas (2 casos).

La población de estudio sí que fue representativa de la población general ya que se cogieron todas las gestantes a las que se les realizó el ratio a excepción de los casos descartados por no tener datos necesarios para el estudio o por tener una edad gestacional inferior de 20 semanas (gestantes que no están incluidas en la definición de PE).

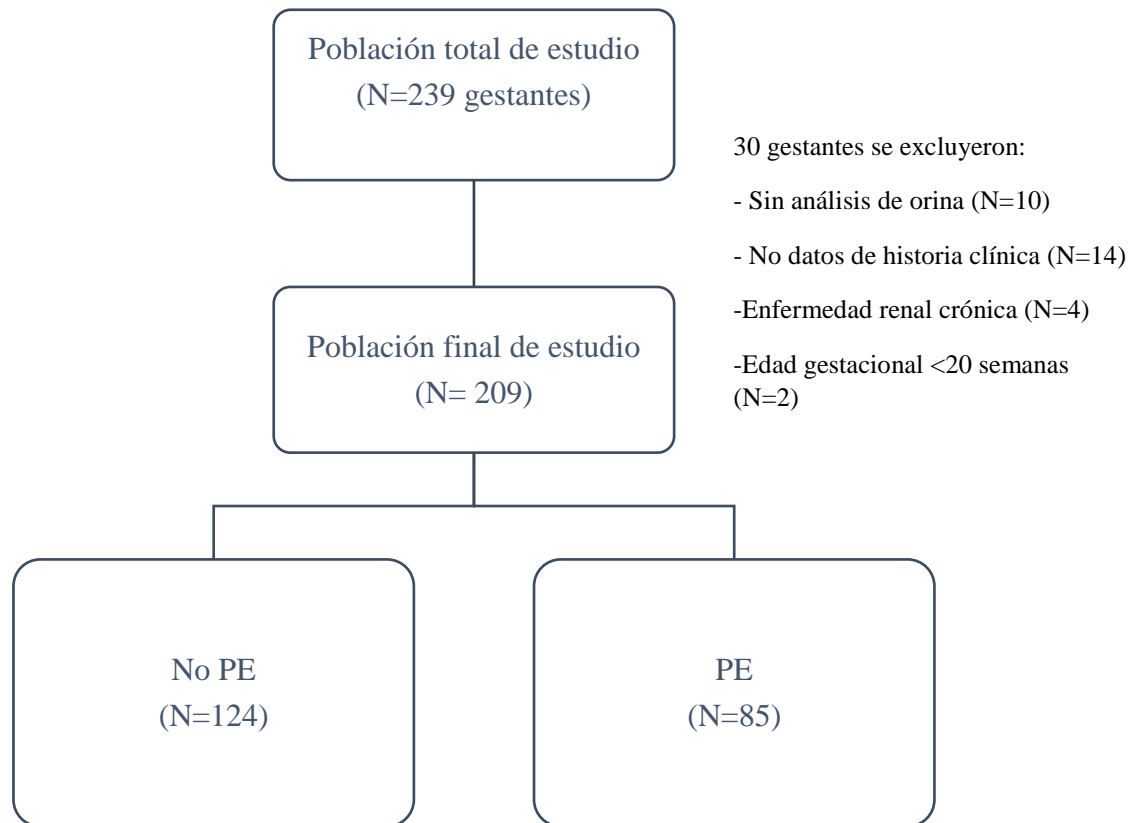


Figura 1. Muestra del estudio.

Características de la población y resultados obtenidos

En el análisis descriptivo de la población se observó en primer lugar, que de las 209 gestantes, 85 desarrollaron PE y 124 no lo hicieron (40,7% versus 59,3%). De las pacientes que desarrollaron PE, 35 (41,2%) fueron PE precoz (<34 semana de gestación) y 50 (58,8%) tardía (≥ 34 semana de gestación).

En cuanto a la variable diabetes gestacional, 43 (20,6%) gestantes sí que tuvieron diabetes durante el embarazo mientras que 166 (79,4%) no desarrollaron diabetes gestacional. En cuanto a las otras variables clínicas estudiadas, de las 209 gestantes: 14 (6,7%) embarazos fueron conseguidos mediante fecundación in vitro (FIV), 34 (16,3%) gestantes tenían hipertensión crónica previa al embarazo y 21 (10,0%) embarazos fueron gemelares.

Para el estudio de las variables cuantitativas, en primer lugar, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer la normalidad de estas variables. En nuestro caso, aquellas variables con $p > 0,05$ seguían una distribución normal mientras que aquellas con $p < 0,05$ no seguían una distribución normal. En cuanto a la descripción de las variables cuantitativas, las variables con distribución normal fueron el IMC, TAD y TAS. Estas se expresaron como media \pm desviación estándar: IMC 30 ± 7 , TAS: 129 ± 17 y TAD: 82 ± 13 .

Las variables que no siguieron una distribución normal se expresaron como mediana y percentil 25 y 75. La edad no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,038$; $p < 0,05$ significativo), siendo la mediana de edad de 34 años y el rango intercuartilico entre 29-38 años. El ratio sFlt-1/PIGF no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,000$; $p < 0,05$ significativo), siendo la

mediana de 42,12 años y el rango intercuartílico entre 7,75-11,12. El sFlt-1 no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,000$; $p < 0,05$ significativo), siendo la mediana de 5176 y el rango intercuartílico entre 2177-9005. El PIGF no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,000$; $p < 0,05$ significativo), siendo la mediana de 155 y el rango intercuartílico entre 74-284. El cociente proteínas/creatinina no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,000$; $p < 0,05$ significativo), siendo la mediana de 179 y el rango intercuartílico entre 119-347. Las proteínas en orina no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,000$; $p < 0,05$ significativo), siendo la mediana de 14 y el rango intercuartílico entre 9,1-37,3. La semana de gestación no seguía una distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p < 0,005$; $p < 0,05$ significativo) siendo la mediana de 34 y el rango intercuartílico entre 30-37. Todo esto aparece resumido en la tabla 2.

Tabla 2. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y descripción de variables cuantitativas.

Variable	Z de Kolmogorov-Smirnov	Significación asintótica (bilateral)	Tipo de distribución	Descripción variable
IMC	1,029	0,240	Normal	30±7
TAS	0,987	0,285	Normal	129±17
TAD	0,734	0,654	Normal	82±13
EDAD	1,407	0,038*	No Normal	34 (29-38)
Ratio sFlt-1/PIGF	3,761	0,000*	No Normal	42,12 (7,75-111,12)
sFlt-1	2,642	0,000*	No Normal	5176 (2177-9005)
PIGF	3,106	0,000*	No Normal	155 (74-284)
Cociente proteínas/creatinina	5,133	0,000*	No Normal	179 (119-347)
Proteínas en orina	5,360	0,000*	No Normal	14,0 (9,1-37,3)
Semanas de gestación	1,725	0,005*	No Normal	34 (30-37)

La distribución normal de las variables se comprobó mediante la prueba de *Kolmogorov - Smirnov*. Las variables de distribución normal se expresaron como media± desviación estándar. Las variables que no siguieron una distribución normal se expresaron como mediana y percentil 25 y 75.

Se realizó el análisis bivalente entre las variables cualitativas observándose que los grupos de estudio (PE versus no PE) no difirieron en cuanto a diabetes, fecundación in vitro (FIV), hipertensión crónica y embarazo gemelar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables ($p > 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Comparaciones entre las variables cualitativas mediante test exacto de Fisher.

		PREECLAMPSIA				p-valor
		SI		NO		
		Recuento	% de N de la columna	Recuento	% del N de la columna	
DIABETES	SI	18	21,2%	25	20,2%	0,863
	NO	67	78,8%	99	79,8%	
FIV	SI	9	10,6%	5	4,0%	0,089
	NO	76	89,4%	119	96,0%	
HTA previa	SI	10	11,8%	24	19,4%	0,182
	NO	75	88,2%	100	80,6%	
GEMELAR	SI	11	12,9%	10	8,1%	0,254
	NO	74	87,1%	114	91,9%	

Con el test t de Student se observó que los grupos de estudio (PE versus no PE) no difirieron en cuanto al IMC, ya que p-valor para el contraste de medias fue de 0,313 ($p > 0,05$), por lo que no se rechazó la igualdad de medias, y se concluyó que ambos grupos eran homogéneos respecto al IMC. Sin embargo, ambos grupos no fueron homogéneos respecto a las variables TAS ni TAD ya que el p-valor para el contraste de medias fue de 0,000* ($p < 0,05$).

En el test de Mann-Whitney, para la edad y semana de gestación el p-valor fue de 0,653 y de 0,645 respectivamente, por lo que ambos fueron mayores a 0,05 por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las gestantes que desarrollaron PE y las que no para estas dos variables. En cambio, para el resto de variables cuantitativas con distribución no normal (ratio sFlt-1/PIGF, sFlt-1, PIGF, cociente proteínas/creatinina, proteínas en orina) el p-valor fue $< 0,05$ por lo que si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las gestantes que desarrollaron PE y las que no (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la variable preeclampsia con las variables cuantitativas con distribución no normal mediante la prueba de Mann-Whitney.

Variable	Significación asintótica (bilateral)
Edad	0,653
Ratio	0,000*
sFlt-1	0,000*

PIGF	0,000*
Cociente PT/creatinina	0,000*
PT orina	0,000*
Semana de gestación	0,645

Se realizó un análisis de regresión logística binaria, tomando como referencia la *Odds Ratio* ajustada, con un intervalo de confianza del 95%. El análisis multivariante se realizó para aquellas variables estadísticamente significativas del análisis univariante realizado previamente. (Tabla 5). De este análisis se concluyó que las variables estadísticamente significativas fueron para las que se obtuvo un p-valor <0,05.

Tabla 5. Análisis multivariante.

	p-valor	Odds Ratio	IC 95%
RatiosFlt1PIGF	,828	,999	0,991-1,007
sFlt1	,002*	1,000	1,000-1,000
COCIENTE PROTEINAS/CREATININA	,536	,999	,996-1,002
PROTEINAS ORINA	,015*	1,074	1,014-1,138
TAS	,001*	1,122	1,048-1,200
TAD	,058*	1,081	,997-1,173
PIGF	,001*	,984	,974-0,993

Se analizó el rendimiento de los distintos marcadores para el diagnóstico de PE mediante curvas ROC. Las áreas bajo la curva (AUC) de cada uno de los biomarcadores para el diagnóstico de PE, así como sus respectivos intervalos de confianza (95%) se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6). Además, se muestra el valor *p* de comparación entre el biomarcador con mayor AUC (en este caso, el cociente sFlt-1/PIGF) y el resto de marcadores. El biomarcador con mejor AUC fue el ratio sFlt-1/PIGF (AUC=0,890).

Tabla 6. Curvas ROC para el diagnóstico de preeclampsia en la población total.

Biomarcador	AUC ROC	p-valor	IC 95%	Valor p de comparación
Ratio sFlt1/PlGF	0,890	<0,001*	0,839-0,929	--
sFlt-1	0,849	<0,001*	0,793-0,895	0,0531
PlGF	0,825	<0,001*	0,767-0,874	0,0013

En la Figura 2 se muestran las curvas ROC de los biomarcadores para el diagnóstico de PE en la población total del estudio.

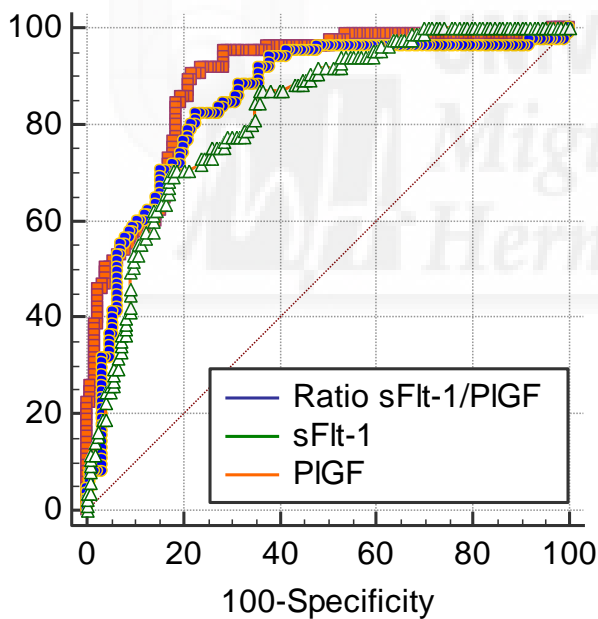


Figura 2. Curvas ROC de los biomarcadores para el diagnóstico de PE.

En cuanto al rendimiento de las magnitudes bioquímicas para el diagnóstico de la PE en la población total del estudio, se obtuvieron puntos de corte óptimos para cada uno de ellos seleccionados de acuerdo al Índice de Youden.

Para un punto de corte del cociente sFlt-1/PlGF de 42, se obtuvieron valores de sensibilidad de 90,59%, especificidad de 78,23%, valor predictivo negativo de 99,8% y unos coeficientes de verosimilitud positivo de 4,16 y negativo de 0,12, siendo el marcador con valores de rendimientos diagnósticos más óptimos.

Los rendimientos de las magnitudes de acuerdo a los puntos de corte seleccionados se detallan a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Rendimientos de las magnitudes bioquímicas para el diagnóstico de PE

Biomarcador	Cut-off*	S% (IC95)	E% (IC95)	LR+ (IC95)	LR- (IC95)	VPP (IC95)	VPN (IC95)
Ratio sFlt1/PlGF	42,12	90,59 (82,3-95,8)	78,23 (69,9 - 85,1)	4,16 (3,0 - 5,8)	0,12 (0,06-0,2)	5,6 (4,0 - 7,7)	99,8 (99,7 - 99,9)
sFlt-1	5450	82,35 (72,6 - 89,8)	77,42 (69,0 - 84,4)	3,65(2,6-5,1)	0,23(0,1-0,4)	4,9(3,6-6,8)	99,7(99,5-99,8)
PlGF	117	70,59 (59,7 - 80,0)	82,11 (74,2 - 88,4)	3,95 (2,6-5,9)	0,36 (0,3-0,5)	5,3(3,6-7,7)	99,5 (99,3-99,6)

Los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) se expresan como porcentaje e intervalo de confianza del 95% (IC95) y los coeficientes de verosimilitud positivo (VP +) y negativo (VP-) se expresan en valor absoluto e intervalo de confianza del 95% (IC95).

*Puntos de corte seleccionados de acuerdo al Índice de Youden

Mediante un análisis de regresión lineal una vez obtenido el punto de corte óptimo para el marcador con mayor rendimiento para el diagnóstico de PE se calculó la odds ratio para medir así la fuerza de asociación (Tabla 8).

Tabla 8. Odds Ratio para el ratio sFlt-1/PlGF \geq 42,12

	OR (IC95%)	p-valor
Ratio sFlt-1/PlGF \geq 42,12	1,008 (1,002-1,013)	0,008*

Además, se propusieron otras serie de puntos de corte para el ratio sFlt-1/PlGF según diferentes sensibilidades o especificidades (Tabla 9).

Tabla 9. Puntos de corte del ratio sFtl-1/PIGF según sensibilidad o especificidad

Sensibilidad	Especificidad	Valor
80,00	81,45	>51,88
85,88	80,00	>46,312
90,00	78,23	>42,16
95,00	71,77	>30,6
97,50	50,00	>12,2375
99,00	3,23	>1,4735

También, se estudió que en función de un valor u otro del ratio el riesgo (bajo, medio y alto) de desarrollar PE era diferente (Tabla 10).

Tabla 10. Riesgo de PE según el valor del cociente sFtl-1/PIGF.

Riesgo	Valor
Bajo	<42
Medio	42-110
Alto	>110

5. Discusión

A día de hoy, la PE constituye un problema de salud de primera línea en todos los países del mundo, ya que constituye una de las principales complicaciones del embarazo, con una elevada morbilidad y mortalidad tanto materna como fetal (1).

En cuanto a la edad, la mediana de las gestantes en el estudio, con 34 años y rango intercuartílico (29 - 38) es representativa de lo que refieren los datos epidemiológicos actuales, con edades maternas superiores a los 30 años, así como la existencia de un 10% de gestantes mayores de 40 años. Es conocido el progresivo retraso en la edad de concebir respecto a décadas pasadas, con mujeres mayores de 38 años en el cuartil superior. Sin embargo, al comparar las variables edad y semana de gestación destacar que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las gestantes que desarrollaron PE y las que no.

También, se estudiaron factores de riesgo cuya asociación con el desarrollo de PE es bien conocida, como la diabetes, las técnicas de reproducción asistida, la hipertensión crónica previa a la gestación y el embarazo

gemelar. Sin embargo, no se obtuvo asociación de estas variables con la PE siendo esto probablemente una limitación de nuestro trabajo debido al bajo número de casos estudiados con estas características.

Tampoco se encontró asociación del IMC con la variable PE, sin embargo sí que se encontró asociación de la tensión arterial sistólica (TAS) y la tensión arterial diastólica (TAD) con el desarrollo de PE. Esto era de esperar ya que la PE se define como la presión arterial $\geq 140/90$ mmHg después de las 20 semanas de gestación.

Al realizar el análisis multivariante casi todas las variables que habían sido significativas en el análisis univariante realizado previamente seguían siéndolo a excepción del ratio y del cociente proteínas/creatinina. La variable TAD tampoco resultó significativa ya que la Odds Ratio ajustada incluía la unidad.

Se planteó la utilidad de los factores reguladores de la angiogénesis y del cociente entre ambos (sFlt-1/PIGF) en el diagnóstico de la enfermedad (12)(21), aunque pocos estudios hasta ahora han evaluado su utilidad en el manejo de las gestantes que acuden al Servicio de Urgencias con signos o síntomas de PE(22)(23).

En nuestra investigación el objetivo fue evaluar principalmente el comportamiento de los factores modificadores de la angiogénesis (sFlt-1 y PIGF) y el cociente sFlt-1/PIGF para poder identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar PE para así poder aplicar las medidas profilácticas necesarias en cada caso. Esto es uno de los grandes retos actuales en el manejo clínico de esta patología que, en algunos casos, puede llegar a ser grave y con consecuencias fatales.

Aunque muchos trabajos han evaluado el rendimiento del sFlt-1/PIGF en el diagnóstico de la PE, existe gran controversia en cuanto a los puntos de corte que se deben utilizar. En 2010, Verlohren y cols publicaron un único punto de corte del cociente angiogénico para diagnóstico de PE si era igual o superior a 85, si bien se apreciaba mejor comportamiento para la PE precoz (S = 89.0%, E = 97.0%) que para la PE tardía (S: 74.0%, E: 89.0%) (24). Posteriormente varios grupos como Schiettecatte J y cols, Gómez-Arriaga y Engels T (25)(26)(27) refieren que ese cut-off era demasiado elevado para el manejo clínico de la sospecha de PE. Ese punto de corte minimiza los falsos positivos, logrando altas especificidades, pero a costa de reducir la sensibilidad. Por ello, el grupo de Stepan, Herraiz y el propio Verlohren han matizado ese punto de corte, rebajando el cut-off a 33 como valor de descarte (rule-out), manteniendo 85 como valor (rule-in) de inclusión diagnóstica para la PE precoz y 110 para la PE tardía (28). Más tarde, este mismo grupo ha modificado discretamente el punto de corte inferior fijándolo en 38 en vez de 33, y a fecha actual así se está recomendando en los posicionamientos europeos (29), en la última publicación de la SEGO, así como en la NICE. Recientemente, Zhao y cols. han evaluado en una meta-análisis el cut-off dual de cociente angiogénico en la estratificación de la PE, es decir, la estrategia de utilizar dos puntos de corte, para la PE precoz y tardía, llegando a proponer en un futuro considerar la raza negra, como variable a incluir, e incluso establecer más valores de referencia según la edad gestacional (30). En enero de 2016, se publica en el New England Journal of Medicine el estudio observacional prospectivo y multicéntrico, denominado PROGNOSIS (Prediction of Short-Term Outcome in Pregnant Women with Suspected Preeclampsia Study) (31). Se trata de un estudio de la máxima importancia actualmente. En él Zeisler y cols, evaluaron el punto de corte de marcadores por debajo

del cual se descartaba PE en el plazo de una semana, así como el punto de corte que pronosticaba la presencia de PE en 4 semanas. Un valor de cociente angiogénico inferior a 38 tenía un VPN del 99.3 % (CI, 97.9-99%) con un 80% de sensibilidad (CI 51.9 -95.7%) y un 78.3 % de especificidad (74.6 a 81.7%). El VPP del cociente angiogénico para el diagnóstico de PE en las siguientes 4 semanas fue del 36.7% (CI 28.4-45.7%) con una sensibilidad del 66.2% (54-77%) y un 83.1 % de especificidad (CI 79-86%). El principal valor del PROGNOSIS por tanto es el descarte (rule-out) del punto de corte de cociente angiogénico igual a 38, útil para todas las edades gestacionales para descartar PE durante una semana. PROGNOSIS presenta al cociente angiogénico con un VPP del 36.7%, que aunque parezca discreto en predicción ya mejora el 20% que se atribuye a la proteinuria en la detección de eventos adversos (32).

En nuestra población, se observó un rendimiento semejante utilizando puntos de corte ligeramente diferentes. Según nuestro estudio, el biomarcador con mejor rendimiento diagnóstico para la PE fue el ratio sFlt-1/PIGF (AUC=0,890) que con un valor del cociente $\leq 42,12$ presentó un valor predictivo negativo $> 99\%$ para descartar PE en la siguiente semana a la de su determinación. Otro punto de corte podría ser 30,6, con este la sensibilidad aumentaría al 95% pero reduciendo la especificidad al 71%. Hay que tener en cuenta que en prevalencias bajas (1,4%), como en nuestro caso, los resultados positivos (VPP) no nos aportan información, pues la probabilidad de estar enfermo es pequeña y los resultados negativos sí nos confirman su ausencia.

Sin embargo, no todas las gestantes con elevación del cociente sFlt-1/PIGF $> 42,12$ fueron casos de PE, y esto fue debido a que se han descrito otras condiciones que pueden alterar el valor de este marcador, como ocurre con el CIR (retraso del crecimiento intrauterino) o con las gestaciones múltiples (33).

Recientemente, dos grupos diferentes han corroborado que PE y CIR presentan un perfil anti-/pro-angiogénico semejante y que por ello, estos marcadores pueden no ser útiles para diferenciar entre ambas entidades. Estos hallazgos justificarían los casos de CIR que resultaron falsos positivos en nuestra población de estudio.

De acuerdo con algunos trabajos, las gestaciones múltiples podrían tener un perfil angiogénico diferente al de las gestaciones sencillas. En nuestro estudio, las gestantes embarazadas de gemelos mostraron niveles superiores de sFlt-1 a las gestaciones sencillas (34) (35).

En definitiva, el cociente sFlt-1/ PIGF es una herramienta útil para excluir la PE en una semana con gran nivel de confianza, mejor que el uso de ambos marcadores por separado por lo que se ha ido introduciendo paulatinamente en la rutina obstétrica en guías clínicas en España al demostrar una elevada sensibilidad en el diagnóstico de esta enfermedad. La fuerza de asociación del ratio sFlt-1/PIGF con la PE fue positiva siendo la Odds Ratio obtenida > 1 ; por lo que un ratio sFlt-1/PIGF $> 42,12$ supone un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Además, se clasificó el riesgo en tres categorías según el valor del ratio siendo bajo (< 42), medio (42-111) o elevado (> 111).

Por último, como limitaciones destacar que el estudio realizado fue unicéntrico y con un pequeño tamaño muestral. Como punto a mejorar, para aumentar el rendimiento del cociente sFlt-1/PIGF en el diagnóstico de PE sería establecer dos puntos de corte diferentes de acuerdo al grupo de edad gestacional uno para PE precoz y otro para PE tardía, ya que una de sus principales ventajas el ratio es la capacidad para reducir las hospitalizaciones innecesarias, lo que se traduce en un ahorro global de costes.

6. Conclusiones

-Los biomarcadores modificadores de la angiogénesis (sFtl-1, PIGF), han mostrado utilidad diagnóstica para diferenciar las gestantes con PE de las que no.

-El cociente sFtl-1/PIGF resultó ser el biomarcador con mejor rendimiento para el diagnóstico de PE con una sensibilidad del 90,59 y un valor predictivo negativo de 99,8 para un punto de corte de 42,12.

7. Bibliografía

1. Parker SE, Werler MM. Epidemiology of ischemic placental disease: A focus on preterm gestations. *Semin Perinatol* [Internet]. 2014;38(3):133-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2014.03.004>
2. Cortés Pérez S, Pérez Milán F, Gobernado Tejedor JA, Mora Cepeda P. Epidemiología de los estados hipertensivos del embarazo. *Clin Invest Ginecol Obstet*. 2009;36(4):132-9.
3. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014;4(2):97-104.
4. Nelson DB, Ziadie MS, McIntire DD, Rogers BB, Leveno KJ. Placental pathology suggesting that preeclampsia is more than one disease. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;210(1):66.e1-66.e7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.09.010>
5. Peraçoli JC, Carvalho R De, Sérgio C, Almeida H De, Costa M, Gustavo L, et al. Pre-eclampsia / Eclampsia. *Rev Bras Ginecol Obs*. 2020;41:318-32.
6. Paré E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim KH. Clinical risk factors for Preeclampsia in the 21st century. *Obstet Gynecol*. 2014;124(4):763-70.
7. Fox R, Kitt J, Leeson P, Aye CYL, Lewandowski AJ. Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *J Clin Med*. 2019;8(10):1625.
8. Herraiz I, Llurba E, Verlohren S, Galindo A, Bartha JL, De La Calle M, et al. Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 2018;43(2):81-9.
9. Chen Y. Novel angiogenic factors for predicting preeclampsia: sFlt-1, PIGF, and soluble endoglin. *Open Clin Chem J*. 2009;2:1-6.
10. Veisani Y, Jenabi E, Delpisheh A, Khazaei S. Angiogenic factors and the risk of preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Int J Reprod Biomed*. 2019;17(1):1-10.
11. Andersen LB, Frederiksen-Møller B, Work Havelund K, Dechend R, Jørgensen JS, Jensen BL, et al. Diagnosis of preeclampsia with soluble Fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio: An inter-assay comparison. *J Am Soc Hypertens* [Internet]. 2015;9(2):86-96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2014.11.008>

12. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672-83.
13. Herraiz I, Simón E, Gómez-Arriaga PI, Martínez-Moratalla JM, García-Burguillo A, López Jiménez EA, et al. Angiogenesis-related biomarkers (sFlt-1/PLGF) in the prediction and diagnosis of placental dysfunction: An approach for clinical integration. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):19009-26.
14. Perry H, Binder J, Kalafat E, Jones S, Thilaganathan B, Khalil A. Angiogenic Marker Prognostic Models in Pregnant Women With Hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2020;75(3):755-61.
15. Ding G, Liping L, Moli D, Wuliyeti A, Shaoh Z, Huijuan W, et al. A study of the association between the sFlt-1/PIGF ratio and preeclampsia in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol [Internet]*. 2018;46(sup3):S281-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1491480>
16. Müller A, Horvat V, Vulin M, Mandić S, Šerić V, Vidosavljević D. The soluble fms-like tyrosin kinase-1 (sFLT-1) to placental growth factor (PIGF) ratio as a possible indicator for the severity of preeclampsia - single institution experience. *Med Glas*. 2019;16(1):53-9.
17. Zhu X, Chen L, Li R. Values of serum sFlt-1 , PLGF levels , and sFlt-1 / PLGF ratio in diagnosis and prognosis evaluation of preeclamptic patients. *Clin Exp Hypertens [Internet]*. 2020;00(00):1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10641963.2020.1756313>
18. Rioja RG, Kirchner MJA, Funes VÁ, Meseguer NB, Rius MC, Llopis MA, et al. Utilidad de los marcadores bioquímicos de preeclampsia. *Rev del Lab Clínico*. 2009;2(4):185-95.
19. Steegers EAP, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
20. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in Pregnancy. *Am J Obs Gynecol*. 2013;122(5).
21. Müller-Deile J, Schiffer M. Renal involvement in preeclampsia: similarities to VEGF ablation therapy. *J Pregnancy*. 2011;2011:176973.
22. Rana S, Hacker MR, Modest AM, Salahuddin S, Lim KH, Verlohren S, et al. Circulating angiogenic factors and risk of adverse maternal and perinatal outcomes in twin pregnancies with suspected preeclampsia. *Hypertension*. 2012;60(2):451-8.
23. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Soto E, Lam J, et al. Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol [Internet]*. 2013;208(4):287.e1-287.e15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.01.016>
24. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol [Internet]*. 2010;202(2):161.e1-161.e11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.09.016>

25. Schiettecatte J, Russcher H, Anckaert E, Mees M, Leeser B, Tirelli AS, et al. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PlGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clin Biochem* [Internet]. 2010;43(9):768-70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.02.010>
26. Gómez-Arriaga PI, Herraiz I, López-Jiménez EA, Gómez-Montes E, Denk B, Galindo A. Uterine artery Doppler and sFlt-1/PlGF ratio: Usefulness in diagnosis of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;41(5):530-7.
27. Engels T, Pape J, Schoofs K, Henrich W, Verlohren S. Automated measurement of sFlt1, PlGF and sFlt1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders. *Hypertens Pregnancy*. 2013;32(4):459-73.
28. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension*. 2014;63(2):346-52.
29. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, et al. Implantación del cociente sFlt-1/PlGF para la predicción y el diagnóstico de la preeclampsia en embarazos únicos: Implicaciones para la práctica clínica. *Progresos Obstet y Ginecol*. 2017;60(1):1-6.
30. Zhao M, Zhu Z, Liu C, Zhang Z. Dual-cutoff of sFlt-1/PlGF ratio in the stratification of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(5):1079-87.
31. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374(1):13-22.
32. Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2001;97(2):261-7.
33. Åsvold OB, Vatten LJ, Romundstad PR, Jenum PA, Karumanchi SA, Anne E. Angiogenic factors in maternal circulation and the risk of severe fetal growth restriction. *Am J Epidemiol*. 2011;173(6):630-9.
34. Kosinska-Kaczynska K, Zgliczynska M, Kozlowski S, Wicherek L. Maternal Serum Placental Growth Factor, Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1, and Soluble Endoglin in Twin Gestations and the Risk of Preeclampsia—A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020;9(1):183.
35. Dröge L, Herraiz I, Zeisler H, Schlembach D, Stepan H, Küssel L, et al. Maternal serum sFlt-1/PlGF ratio in twin pregnancies with and without pre-eclampsia in comparison with singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(3):286-93.