



Universidad
Zaragoza



Hospital Universitario
Miguel Servet

Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la preeclampsia desde un punto de vista bioquímico y puesta a punto de la técnica basada en el colorante rojo Congo para su detección en orina reciente



Study of preeclampsia from a biochemical point of view and development of the technique based on Congo red dye for its detection in recent urine

Autor/a: Pilar Benito Agudo

Directores/as:

Dra. María Santamaría González

Dr. Jesús de la Osada García

Grado en Biotecnología – Curso 2020/2021

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	ABSTRACT.....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y PRESENTACIÓN DEL PROYECTO.....	4
3.2.	ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA GESTACIÓN.....	6
3.2.1.	TASA DE FILTRADO GLOMERULAR.....	6
3.2.2.	CREATININA Y ÁCIDO ÚRICO.....	7
3.2.3.	PROTEÍNAS.....	7
3.2.4.	GLUCOSA.....	7
3.2.5.	VOLUMEN DE LÍQUIDO CORPORAL.....	7
3.3.	TÉCNICA BASADA EN EL COLORANTE ROJO CONGO.....	8
4.	OBJETIVOS.....	8
5.	METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	9
5.1.	SELECCIÓN DE PACIENTES Y CLASIFICACIÓN INICIAL.....	9
5.1.1.	ENTREVISTA CON LAS VOLUNTARIAS.....	9
5.1.2.	CLASIFICACIÓN DE LAS PACIENTES.....	9
5.1.3.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y CALIDAD DE LA MUESTRA.....	10
5.1.4.	TAMAÑO MUESTRAL DEL ESTUDIO.....	10
5.2.	RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE DATOS.....	11
5.3.	PROTOCOLO PARA ALMACENAR LAS MUESTRAS DE ORINA.....	12
5.4.	DISEÑO, ELABORACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN BASADA EN EL COLORANTE ROJO CONGO.....	12
5.4.1.	MATERIAL.....	12
5.4.2.	PROCEDIMIENTO.....	13
5.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	14
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
6.1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	14
6.2.	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	15
6.2.1.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN EL EMBARAZO Y SUS COMPLICACIONES.....	15
6.2.2.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN LA PREECLAMPSIA SEGÚN SU GRAVEDAD.....	18
6.3.	TEST DE DETECCIÓN BASADO EN EL COLORANTE ROJO CONGO.....	20
7.	CONCLUSIONES.....	22
8.	CONCLUSIONS.....	23
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

ANEXO I – Recolección y almacenamiento de datos.....	26
ANEXO II – Materiales.....	27
ANEXO III – Análisis descriptivo.....	28
ANEXO IV – Rojo Congo en ERC.....	30

1. RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una complicación propia del período gestante. Su aparición tardía suele retrasar el diagnóstico, suponiendo un riesgo añadido a la gestación. La etiología no está clara, pero la teoría más aceptada defiende un origen multisistémico relacionado básicamente con una invasión trofoblástica defectuosa causante de hipoxia. La sintomatología clínica comienza con hipertensión arterial y proteinuria, pero no son los únicos síntomas presentes en la enfermedad. El mayor problema de esta patología es su rápida progresión y la inexistencia de un método de detección económico.

Se ha observado que durante el embarazo se producen cambios adaptativos a la nueva situación fisiológica, que pueden ser percibidos a través de los parámetros bioquímicos, pero existen pocos estudios que expliquen los cambios bioquímicos que se producen durante un episodio de PE.

Con este proyecto se pretende valorar y caracterizar las variaciones bioquímicas de la orina durante el embarazo, además de adaptar la técnica de detección de proteínas en orina basada en el colorante rojo Congo (RC) para detectar la PE en embarazadas. Para ello se han estudiado 55 voluntarias.

Los resultados más relevantes de este proyecto sugieren que la PE es una enfermedad que cursa con daño renal, advirtiendo variaciones en los parámetros bioquímicos urinarios. Además, se demuestra que la técnica basada en RC se puede utilizar como test de detección rápida de proteínas en orina con bajo coste. Este estudio nos ha permitido conocer en mayor medida una enfermedad que causa miles de muertes maternas cada año.

2. ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a complication typical of the pregnant period. Its late appearance usually delays the diagnosis, assuming an added risk to pregnancy. The etiology is not clear, but the most accepted theory defends a multisystemic origin basically related to a defective trophoblastic invasion causing hypoxia. The clinical symptoms begin with high blood pressure and proteinuria, but they are not the only symptoms present in the disease. The biggest problem with this pathology is its rapid progression and the lack of an inexpensive detection method.

It has been observed that during pregnancy adaptive changes occur to the new physiological situation, which can be perceived through biochemical parameters, but there are few studies that explain the biochemical changes that occur during an episode of PE.

This project aims to assess and characterize the biochemical variations of urine during pregnancy, in addition to adapting the technique for detecting proteins in urine based on Congo red dye (CR) to detect PE in pregnant women. For this, 55 volunteers have been studied.

The most relevant results of this project suggest that PE is a disease that causes kidney damage, noting variations in urinary biochemical parameters. Furthermore, it has been shown that the CR-based technique can be used as a low-cost rapid urine protein detection test. This study has allowed us to better understand a disease that causes thousands of maternal deaths each year.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

Una gran parte de las gestaciones se desarrollan y concluyen sin contratiempos. Sin embargo, existen embarazos que cursan con complicaciones, poniendo en juego la vida de la madre y del futuro bebé. Éste es el caso de la preeclampsia (PE), una enfermedad cuyos síntomas clínicos pueden comenzar a manifestarse tras la semana 20 de gestación e incluso aparecer de forma tardía a partir de la semana 34. Se caracteriza por hipertensión y proteinuria, pero puede llegar a provocar disfunción de los órganos maternos (1–4).

El problema actual se centra en la dificultad para distinguir la PE de otras patologías con una sintomatología similar, como la hipertensión crónica o gestacional. Se han realizado muchos intentos por encontrar una prueba bioquímica con suficiente capacidad predictiva en las primeras fases del embarazo y anticiparse a la etapa de desarrollo clínico, pero el único tratamiento eficaz hoy en día es el parto prematuro del feto y la placenta. Esta condición puede ser perjudicial para el bebé, pero si no se lleva a término, la enfermedad evoluciona a eclampsia, una forma más grave donde la madre puede sufrir convulsiones, accidente cerebrovascular, insuficiencia hepática e incluso la muerte (2,4,5).

Actualmente, la fisiopatología de la PE no está clara (1), pero la hipótesis más aceptada propone que se produce por una invasión trofoblástica defectuosa con hipoperfusión uteroplacentaria asociada. Durante un embarazo sin complicaciones, el desarrollo del feto se ve favorecido por un aumento de la perfusión del flujo sanguíneo hacia el útero, gracias a la transformación fisiológica de las arterias espirales, llevada a cabo por la invasión del trofoblasto (1,5). Estudios recientes defienden que el factor de inicio en la PE sería la privación de oxígeno, generando una situación de isquemia placentaria capaz de regular la expresión del receptor 1 soluble del factor de crecimiento del endotelio vascular (sFlt-1) a través del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), el cual en condiciones normales se degradaría (4,5).

sFlt-1 se trata de una proteína antiangiogénica sintetizada en la placenta y liberada a la circulación materna como consecuencia de la disfunción del trofoblasto. Constituye una forma soluble del receptor de varios factores de crecimiento del endotelio vascular, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF). Estos factores son glicoproteínas diméricas, cuya función es potenciar la formación de los vasos sanguíneos a partir de sus células progenitoras. VEGF es liberado por el citotrofoblasto y se considera un factor angiogénico al promover la supervivencia celular, la permeabilidad vascular y la síntesis de óxido nítrico (ON), mientras que PlGF es un homólogo de VEGF, también liberado por el trofoblasto, y aunque su función no está tan estudiada, presenta actividad angiogénica (4,5).

En un embarazo sin complicaciones, la función del receptor endotelial Flt-1 es permitir la vascularización del endotelio a través del ON y modular la disponibilidad de los factores de crecimiento, para evitar los problemas causados por la acumulación de los mismos. Sin embargo, durante el embarazo preeclámpico, existe una sobreproducción de sFlt-1, de modo que los factores de crecimiento permanecen secuestrados por el receptor soluble y reducen su disponibilidad para el receptor endotelial, sin poder ejercer sus funciones angiogénicas, y generando estrés oxidativo por la desregulación en la producción de ON (4).

La sobreproducción de sFlt-1 por parte de la placenta se explica por la sobreexpresión del gen *Flt-1* (OMIM * 165070), que en condiciones normales se encuentra regulado por el nivel de oxígeno, favoreciéndose en condiciones de hipoxia la forma soluble, que difiere del receptor de membrana en que no se codifica la región de expansión transmembrana y los dominios de tirosina quinasa intracelulares, pero sigue presentando una gran afinidad por los factores angiogénicos VEGF y PlGF (5).

Existen evidencias de que una gran concentración de PlGF es capaz de desplazar la unión de VEGF-sFlt-1, de esta forma VEGF se une a su otro receptor, KDR. Actualmente, se estudia el uso del ratio sFlt-1/PlGF como biomarcador prometedor en el diagnóstico clínico de PE y para predecir la gravedad de la enfermedad (1,2,5).

El ratio sFlt-1/PlGF en suero ha demostrado ser clínicamente útil para el diagnóstico de PE (6), e incluso se han desarrollado ensayos automatizados para mediciones de sFlt-1 y PlGF en suero, plasma u orina (2). El principal inconveniente de estas técnicas es que requieren de equipos muy específicos que no siempre están disponibles en los laboratorios, aunque presentan abundantes ventajas como la detección de PE a mitad del embarazo o la capacidad discriminativa entre pacientes con PE y pacientes con hipertensión gestacional o crónica (1).

Actualmente no existe una técnica sencilla, rápida, que no requiera recursos excesivos y con elevado rendimiento diagnóstico que permita detectar de forma rápida y precoz un episodio de preeclampsia. Sin embargo, investigaciones recientes demuestran la asociación de agregados amiloides en la orina con la PE y apuestan por el rastreo de estas proteínas como técnica de detección (2). Entre los agregados amiloides se ha identificado a la proteína serpina, también conocida como α -1-antitripsina. Se trata de una proteína plasmática abundante involucrada en la inhibición de serin proteasas, proceso que desencadena condiciones de hipoxia en el ambiente (1).

Durante la PE, el trofoblasto aumenta la síntesis de serpina, con la consiguiente formación de depósitos amiloides detectables a través de la orina mediante técnicas basadas en afinidad con ciertos colorantes. Esta proteína presenta la capacidad de desplegarse y agregarse en estructuras supramoleculares durante el transcurso de la enfermedad. La consecuencia que se plantea es una disminución de los niveles de enzimas proteolíticas, además de favorecer la hipoxia característica de la PE. Aun con todo ello, no todas las pacientes de PE presentan serpina en orina, pues solo lo hacen aquellas que cursan con unas características menos favorables como mayor presión arterial y proteinuria severa. Por tanto, la detección de serpina en orina puede orientar sobre la gravedad de la preeclampsia con una especificidad muy elevada (1).

Otros estudios menos recientes sugieren que los agregados amiloides se generan a consecuencia de un desequilibrio en la proteína precursora de la serpina, denominada proteína precursora amiloide (APP). Este desequilibrio se debe a la sobreexpresión de las enzimas procesadoras de la APP a nivel de la placenta (7).

Existen publicaciones que demuestran que las proteínas mal plegadas se acumulan en la orina, el suero y la placenta de las mujeres con PE, siendo un posible biomarcador de la enfermedad. Por el contrario, otros estudios afirman que la producción y agregación de amiloides son consecuencia de la hipoxia, isquemia placentaria y del resto de cambios fisiológicos que ocurren en el transcurso de la enfermedad. Podemos observar que existen varias posibilidades, y si bien sabemos que los amiloides tienen un

papel importante en la patología, se requieren más investigaciones para conocer la causa/consecuencia (2).

Con todo ello, estudios recientes concluyen que la exploración de amiloides en la orina de mujeres con PE podría ser una buena aproximación para el diagnóstico precoz de la patología, sobre todo en entornos con pocos recursos. Esto puede llevarse a cabo gracias a la afinidad que presentan las proteínas que forman parte de los agregados amiloides hacia el colorante rojo Congo (RC), lo que se conoce como congofilia. El fundamento de la congofilia se basa en la propiedad del colorante de unirse a los radicales libres de la celulosa y, a su vez, la capacidad que tiene de interactuar con las proteínas mal plegadas de la orina que presenten estructuras similares a la hoja β , como ocurre con la serpina (1,7,8). Esta propiedad hace posible el desarrollo de un test, *CR Dot test*, que permite mediante una escala cromática visual determinar si la embarazada presenta o no PE (9). Esta prueba ha tenido mejor valor predictivo para la PE en comparación con el ratio sFlt-1/PlGF (7). Sin embargo, hay que tener presente que existen otras patologías que pueden desarrollar agregados de proteínas en la orina, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares o enfermedades renales (1).

Según publicaciones previas, la técnica basada en congofilia urinaria es útil en el diagnóstico precoz porque puede observarse en una etapa temprana de la fase asintomática de la PE. Una vez puesta a punto, requiere de poco tiempo, se pueden reducir costes de forma razonable y, si el resultado es claro, no requiere del uso de técnicas posteriores que lo corroboren (2). Una de las ventajas más importantes es que se trata de una técnica no invasiva que se puede realizar sobre una muestra de orina reciente (9).

La diferencia entre la PE y una patología similar, como la hipertensión gestacional, se basa en la presencia/ausencia de proteinuria. La técnica *gold standard* para la determinación de proteinuria es la recolección de orina en 24 horas, pues evita variaciones asociadas a factores como el ejercicio, la dieta y la excreción de agua, que pueden conducir a la inexactitud en la concentración proteica de la orina recogida en una única micción. Sin embargo, esta prueba induce errores pre-analíticos por la dificultad a la hora de garantizar la recolección completa, lo que desemboca en un retraso del diagnóstico y un mal control del paciente (10). Gracias a estudios correlativos, se pueden establecer equivalencias entre el contenido proteico en orina de 24 horas y en orina reciente (3,11,12).

Con este proyecto se pretende evaluar las cualidades de la orina durante el embarazo y caracterizar las variaciones bioquímicas durante episodios de preeclampsia, además de adaptar la técnica de detección de agregados de proteínas en orina basada en la congofilia para detectar de forma rápida y precoz la PE en embarazadas (13).

3.2. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA GESTACIÓN

3.2.1. TASA DE FILTRADO GLOMERULAR

Uno de los parámetros con gran relevancia para el estudio es la tasa de filtración glomerular (TFG), dependiente del flujo plasmático renal (FPR). Durante la gestación, el flujo de sangre que reciben los riñones por unidad de tiempo se ve incrementado hasta un 75% en la semana 16 del embarazo. Éste se reduce a partir de la semana 34, pero sigue siendo muy superior al FPR de una mujer no embarazada.

La consecuencia es una mayor filtración de sangre por parte del glomérulo, aumentando hasta un 50% el TFG al final del primer trimestre (4,14,15).

Cabe destacar que el aumento de la filtración transcurre sin hiperpresión glomerular gracias a un mecanismo de adaptación donde el ON es fundamental. De no ser así, podría tener consecuencias lesivas a largo plazo para la madre. Estudios recientes defienden que en el transcurso del embarazo aparece una mayor expresión de la óxido nítrico sintasa (ONs) en los riñones, provocando una disminución de la presión arterial durante el primer trimestre de gestación y una disminución de la resistencia renal (4,14). Un fallo en este mecanismo puede conllevar la aparición de PE (14).

3.2.2. CREATININA Y ÁCIDO ÚRICO

La hiperfiltración glomerular tiene consecuencias a nivel sérico en algunos parámetros, como es el caso de la creatinina y el ácido úrico. La creatinina disminuye en el tercer trimestre, mientras que el ácido úrico alcanza niveles mínimos en las 24 semanas de gestación. Sin embargo, a partir de esta semana, los niveles de ácido úrico comienzan a aumentar gracias a una mayor absorción tubular renal de urato y la producción de ácido úrico por parte del feto. Esto permite que al final del embarazo los valores de ácido úrico se estabilicen y mantengan cifras similares a las de la preconcepción (4,14–16). La hiperuricemia es uno de los signos que se encuentra asociado con las complicaciones de la preeclampsia, pero considerarla como un factor de predicción es un tema en debate (14,15).

3.2.3. PROTEÍNAS

Durante el embarazo la excreción urinaria de proteínas se ve aumentada, llegando a alcanzar en situaciones patológicas, como la PE, niveles de 300 mg de proteínas en orina de 24 horas, lo que se define como proteinuria. Gracias a estudios correlativos, reflejados en guías de práctica asistencial y documentos de consenso, podemos determinar que 300 mg de proteínas en orina de 24h equivalen a 30 mg/dL de proteínas (+1 en tira) en orina reciente (3,4,14). En definitiva, estudios recientes concluyen que el aumento significativo de proteína en la orina no se observa cuando se compara entre distintos trimestres del embarazo, pero si cuando se realiza una visión global desde el principio hacia el final de la gestación (14).

3.2.4. GLUCOSA

Durante el embarazo es normal la excreción aumentada de glucosa en orina, aun presentando niveles normales de glucosa en sangre. Esto se debe al aumento del TFG, pues su incremento produce una mayor carga de glucosa en los túbulos. Como consecuencia, se desencadena una adaptación del sistema renal reduciendo el umbral de reabsorción de glucosa mediante la disminución de la expresión de los transportadores de glucosa en el túbulo (4,14).

3.2.5. VOLUMEN DE LÍQUIDO CORPORAL

El embarazo es una situación que concurre con un incremento constante del volumen corporal. Se debe al agua retenida por el feto, por la placenta y por el líquido amniótico; pero también al agua retenida por los tejidos de la madre. Un condicionamiento de esta expansión puede desembocar en un mayor riesgo de padecer PE (14,15).

Es necesario recalcar que el volumen corporal alcanzado en el embarazo está relacionado con la osmorregulación materna. Debido a las hormonas gestacionales y a un aumento en la producción de ON, la presión arterial se ve disminuida, provocando una mayor producción de aldosterona para evitar la pérdida de sodio y aumentar su reabsorción. A causa de esta disminución de la presión arterial, la ADH también ve aumentada su producción, provocando una mayor retención de agua por parte del riñón (14,16).

3.3. TÉCNICA BASADA EN EL COLORANTE ROJO CONGO

La congofilia es una propiedad muy relevante que presentan algunas orinas. Es bien conocido que el RC se une a las fibras de celulosa a través de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo y, debido a su configuración molecular plana, el RC se intercala entre la celulosa. El mismo principio se aplica a las proteínas mal plegadas que, debido a la abundancia de láminas β , tienen una disposición espacial similar a la de las fibras de celulosa.

Cuando se aplica una solución acuosa de RC sobre papel, el colorante forma enlaces de hidrógeno con la celulosa, lo que ralentiza su flujo a través de la superficie porosa del papel, dejando como rastro un estrecho círculo. Si una muestra contiene proteínas agregadas, como es el caso de una orina recogida durante un episodio de PE, se mezcla con el colorante y una parte de éste se intercalará entre ellas dejando poco RC disponible para la unión a la celulosa. Esto explica que las orinas de pacientes con preeclampsia se extienden en el papel formando un amplio círculo rosa homogéneo cuando se mezclan con soluciones acuosas de RC, pues todo el colorante está involucrado en los agregados amiloides y no puede interactuar con la celulosa. Si el círculo central aún es visible, todavía existe RC libre y disponible para unirse a la celulosa (9,13).

Procedemos a adaptar y poner a punto la técnica de RC, probando varias superficies celulósicas, las cuáles han sido seleccionadas para disminuir el coste inicial del método y contribuir a la sostenibilidad medio ambiental.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es analizar las características bioquímicas en la orina y evaluar si existen variaciones importantes entre pacientes no gestantes, gestantes sin patologías, gestantes con HTA y gestantes con distintos grados de PE. Para ello, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- Estudio de la función renal por medio del análisis de parámetros bioquímicos en muestras de orina.
- Valoración de los cambios hemodinámicos renales.
- Evaluación del grado de proteinuria en gestantes con preeclampsia.
- Estudio de la homeostasis mediante la estimación del volumen hídrico corporal.
- Desarrollo del test de detección rápida de RC para detectar episodios de preeclampsia.

5. METODOLOGÍA Y MATERIALES

5.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y CLASIFICACIÓN INICIAL

El estudio se llevó a cabo en población femenina en edad reproductiva (18-45 años) que no presentaba enfermedad renal crónica, diabetes o hipertensión arterial. Las pacientes fueron reclutadas durante su procedimiento de análisis rutinario en la unidad de preanalítica del Hospital Universitario Miguel Servet. Para facilitar el análisis, inicialmente se establecieron dos grupos de estudio: un grupo de mujeres con gestación en curso y un grupo de mujeres no gestantes, y la finalidad fue recoger, ordenar y agrupar los datos de las voluntarias que cumplían con los criterios de inclusión que se establecieron en el estudio.

Cabe mencionar que el proyecto contó con la aprobación del **Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad Autónoma de Aragón (CEICA)**, tras presentar ante tribunal evaluatorio los protocolos y los documentos de información y consentimiento elaborados previamente al reclutamiento de las voluntarias.

5.1.1. ENTREVISTA CON LAS VOLUNTARIAS

Las gestantes llegaban a la sección de preanalítica del hospital para realizarse una serie de controles analíticos a lo largo de su embarazo. Estas pacientes accedían a la extracción a través de los boxes 2 y 3, donde se habilitó una zona para que aquellas interesadas en participar pudieran ser entrevistadas. Además, se contó con la compañía del personal facultativo y de enfermería para abordar a las pacientes de una forma en la que no se viera comprometida su confidencialidad. Por otro lado, las pacientes gestantes también acudían dentro del control rutinario a realizarse la curva de glucemia, siendo otro momento para poder realizar la entrevista.

Para el grupo de pacientes no gestantes, el procedimiento fue similar. Las enfermeras fueron quienes consultaron a las pacientes si era de su interés participar.

En ambos casos, la entrevista estaba diseñada para informar a las pacientes sobre el estudio y que pudieran resolver todas sus dudas, y además se incluyeron cuestiones para conocer si cumplían los criterios de inclusión: mujer en edad fértil (<45 años) y sin antecedentes personales de diabetes mellitus, hipertensión arterial o enfermedad renal. Exigimos estos requisitos puesto que son patologías que pueden provocar una alteración de la función renal, liberando así proteínas en orina y generando confusión en los resultados.

Una vez la paciente había cumplimentado el documento de información facilitando su consentimiento, ya era consciente de que estaba dotando de permiso para recoger los excedentes de sus muestras de orina, además de conceder el derecho a consultar los resultados, obtenidos de sus muestras, de los parámetros bioquímicos relevantes en el estudio.

5.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PACIENTES

Una vez analizadas las muestras y diseñada la base de datos con los resultados, las voluntarias que habían superado la entrevista inicial fueron distribuidas en 4 grupos en función de los siguientes criterios de clasificación, obtenidos de las guías clínicas de práctica asistencial (3).

- Pacientes no gestantes: voluntarias que se encuentran en edad fértil sin gestación en curso.
- Pacientes gestantes sin patología: voluntarias embarazadas sin signos clínicos de hipertensión arterial (HTA) o preeclampsia (PE).
- Pacientes gestantes con HTA: voluntarias embarazadas con una TAs>140 mmHg y/o TAd>90 mmHg en dos ocasiones consecutivas, pero sin proteinuria.
- Pacientes gestantes con PE: voluntarias embarazadas con HTA y proteinuria. Además, se establece una subclasificación en función de la gravedad (leve o grave). El grupo de PE grave presenta alguno de los siguientes signos clínicos:
 - TAs>160 mmHg y/o TAd>110 mmHg.
 - TAs>140 mmHg y/o TAd>90 mmHg, acompañada de proteinuria severa (definida como una concentración de proteínas en orina reciente por encima de 3g/L).

5.1.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y CALIDAD DE LA MUESTRA

Para garantizar la calidad de los resultados, se decidió excluir del estudio las siguientes muestras de orina:

- No recolección, muestra insuficiente o recolección inadecuada de orina reciente.
- Concentración de creatinina inferior a 30 mg/dL.
- Alteración del sedimento urinario, valorado mediante microscopía óptica:
 - Hematuria, definida por la presencia de 10 o más hematíes por campo.
 - Leucocituria, definida por la presencia de 10 o más leucocitos por campo.
 - Datos sugerentes de infección urinaria, siendo éstos leucocituria con bacteriuria y/o positividad en nitritos.

5.1.4. TAMAÑO MUESTRAL DEL ESTUDIO

Un total de 56 voluntarias dieron su aprobación para participar en el estudio y 1 fue descartada por no cumplir los criterios de inclusión. Con todo ello, el tamaño muestral de estudio fue de un total de 55 voluntarias.

Hay que tener en cuenta que el nº de gestantes que acuden al hospital para sus análisis de rutina se encuentra, aproximadamente, en 50 a la semana. Sin embargo, el tamaño muestral constituye la principal limitación del estudio, pues la entrevista con las voluntarias y la recolección de las muestras comenzó tras la aprobación del consentimiento informado por parte del CEICA, fecha próxima a la finalización del proyecto.

Por todo ello, los grupos de estudio se distribuyeron en: 15 mujeres no gestantes; 16 gestantes sin patología; 10 gestantes con HTA; 4 gestantes con PE leve; 9 gestantes con PE grave y 1 mujer no gestante con ERC. Cabe destacar que la voluntaria con ERC dispuso su muestra únicamente para la puesta a punto de la técnica basada en rojo Congo.

5.2. RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE DATOS

Todas las muestras que llegaron al laboratorio fueron analizadas de forma habitual y se guardó congelada una alícuota de orina (>1mL) hasta el momento de realizar la técnica de RC. Los resultados fueron recopilados a través del sistema informático del laboratorio (*Modulab-Werfen®*).

Se diseñó una base de datos con los resultados de cada uno de los parámetros, contenidos en la [tabla 5 \(anexo I\)](#), de las muestras de las voluntarias para realizar las comparaciones oportunas. Para la elaboración de la base de datos se utilizó el programa *excell (Microsoft office Profesional Plus 2019)*.

Dentro de lo posible y si alguno de los parámetros no se encontraba solicitado como parte del procedimiento asistencial habitual de la muestra de orina, el facultativo del laboratorio lo añadía dentro del análisis por su gran relevancia en el proyecto. Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en las instrucciones del analizador, y detallada a continuación:

- Cuantificación proteica (OPT)

La cuantificación proteica en las muestras de orina es uno de los parámetros más relevantes por ser uno de los signos presentes en los episodios de PE. Para ello, el analizador *Beckman Coulter AU* utiliza un método colorimétrico y mide un cambio de absorbancia de 470 nm, del complejo formado por rojo de pirogalol y molibdeno, a 600 nm, cuando se unen a él los grupos amino de las proteínas presentes en la muestra. Todo ello concluye con que la absorbancia a 600 nm es directamente proporcional a la concentración proteica de la muestra.

- Osmolalidad

Para determinar la osmolalidad se recogió una alícuota de la muestra de orina original y se dispuso en el osmómetro *OSMO STATION OM-6050*. Este analizador utiliza el descenso del punto de congelación, basado en el enfriamiento criogénico, para realizar la determinación de la presión osmótica de la muestra.

- Determinación iónica

Las concentraciones de los iones en orina se midieron por potenciometría indirecta a través de electrodos selectivos utilizando el módulo ISE de los analizadores *Beckman Coulter AU*.

El módulo ISE para Na⁺, K⁺ y Cl⁻ emplea electrodos con membrana de éter para el sodio y el potasio, y una membrana de orientación molecular de policloruro de vinilo para el cloruro (específicos para cada ion de interés en la muestra). Se desarrolla un potencial eléctrico según la ecuación de Nernst para cada ion y, cuando se compara con una referencia interna, este potencial eléctrico se convierte en voltaje y después en concentración del ion correspondiente en la muestra.

En todos los casos, los reactivos estaban listos para su uso y únicamente había que disponerlos en el equipo AU. Los equipos informan del valor del parámetro en la muestra de forma automática.

Para el aseguramiento de la calidad analítica se cuenta con controles internos diarios y externos mensuales de todos los parámetros bioquímicos analizados.

5.3. PROTOCOLO PARA ALMACENAR LAS MUESTRAS DE ORINA

Se observó la necesidad de elaborar un protocolo para mantener la máxima integridad de las muestras de orina, ya que en el momento de su recepción era necesario preparar una alícuota de la muestra original y guardarla para la técnica basada en colorante, que comenzaría tras la finalización del estudio de los parámetros bioquímicos. Por ello se realizó una búsqueda bibliográfica previa para consultar la afectación de las variaciones de temperatura sobre los excedentes de orina y los pasos a seguir para la preparación de las alícuotas:

- 1) Tras realizar la medida de la osmolalidad de la muestra original, se transfirió una porción a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 2) Después, se recogió el sobrenadante y se transfirió a una alícuota para almacenarla a -20°C durante una semana. Transcurrido este período, se trasladó a -80°C hasta el momento de su utilización.
- 3) Llegado el momento de realizar el test rojo Congo, se descongelaron las muestras de interés siguiendo el procedimiento de descongelación directa desde -80°C a temperatura ambiente.

Finalmente, una vez las muestras habían sido utilizadas, se desecharon con criterios de orden y seguridad.

5.4. DISEÑO, ELABORACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN BASADA EN EL COLORANTE ROJO CONGO

5.4.1. MATERIAL

– Papel

En el proyecto se utilizaron tres tipos de papel con distintas características, que constituyen la matriz sobre la que se aplicaron las muestras. Esta información se encuentra recogida en la tabla 6 (anexo II).

Las dimensiones para cada tipo de papel se diseñaron en 9 cm de largo y 5 cm de ancho para cada réplica, ya que se comenzó con papeles más pequeños y las muestras no tenían suficiente espacio para correr, saliéndose sobre la cartulina.

– Cartulina

Constituye el soporte sobre el que se asienta el papel. Presenta color gris y un tamaño de folio A4.

Tras la puesta a punto de la técnica, se decidió utilizar una cartulina por paciente. Cada cartulina se dividió en tres filas, con una altura de 6 cm y una anchura de 9 cm por fila. Además, en la parte superior se guardaron 3 cm para indicar el nº de paciente al que corresponde la muestra evaluada y el diagnóstico médico correspondiente. De este modo, se pudo determinar visualmente si el resultado del test RC era el esperado en función del diagnóstico médico preestablecido.

Para el blanco se utilizó una fila en una cartulina aparte y, para la representación de los resultados, se procedió a un montaje entre las imágenes para mostrar toda la información.

– Solución acuosa de RC al 0,5%

Se utilizaron 5 µl de solución acuosa al 0,5% de RC por cada 150 µl de muestra de orina. El colorante utilizado fue rojo Congo en polvo (puro) de la marca *Merck* y con referencia 1340 *Kongonut*.

Para la puesta a punto de la técnica, y la posterior evaluación del resto de las muestras, se preparó una disolución al 0,5% de RC con agua milli-Q adicionando a un volumen de 100 ml de agua 0,5 gramos de colorante.

– Suero fisiológico

Para realizar el blanco, se utilizaron 5 µl de solución RC por cada 150 µl de suero fisiológico, siendo su composición 2,25 g de cloruro sódico y un pH=5,5.

5.4.2 PROCEDIMIENTO

Teniendo en cuenta que por cada clase de papel se realizó un duplicado de la muestra y un blanco, el procedimiento en cada tipo de papel fue el siguiente:

- 1) Se dispusieron tres papeles en la primera columna de una cartulina.
- 2) Se utilizó un tubo *ependorf* para cada muestra, donde se realizó la mezcla de 5 µl de solución acuosa rojo Congo al 0,5% y 150 µl de orina. Se preparó la segunda réplica siguiendo el mismo procedimiento, y el blanco sustituyendo los 150 µl de orina por 150 µl de suero fisiológico.
- 3) Cada mezcla se homogeneizó con la ayuda de la micropipeta y se esperó un minuto.
- 4) Tras esperar el tiempo establecido, se dispusieron los 155 µl de cada *ependorf* con la micropipeta sobre cada uno de los papeles. De este modo, en la primera posición se aplicó la 1ª réplica de la muestra de orina, en la segunda posición se pipeteó la 2ª réplica y en la tercera posición se añadió el blanco.
Fue conveniente utilizar una superficie plana y lisa para disponer el papel y evitar desprendimientos de volumen.
- 5) Tras esperar 5-10 minutos se pudieron interpretar los resultados de forma visual.
- 6) Se midieron los diámetros de los círculos formados en cada réplica de la muestra y se calculó la media. Asimismo, se midió el diámetro del círculo formado en el blanco y se obtuvo un ratio para cada muestra y papel utilizado.

Todos estos pasos se repitieron en las dos siguientes columnas sustituyendo el tipo de papel por cualquiera de los otros dos que se pretendían ensayar. Se evaluó la capacidad discriminatoria de cada papel en función ratio obtenido entre un resultado positivo y un resultado negativo. A mayor ratio, mejor desplazamiento de las muestras positivas y mayor la diferencia observada con las negativas.

En la puesta a punto de la técnica se utilizaron 4 muestras, una por cada grupo de estudio: embarazo sano – HTA – PE leve – PE grave, y además se incluyó una muestra de una mujer con insuficiencia renal diagnosticada. Así, pudimos observar el comportamiento del colorante en cada situación.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Una vez recabada toda la información y almacenada de forma organizada en la base de datos, se procedió al análisis estadístico de los parámetros bioquímicos (tabla 5, anexo I). Además, se llevó a cabo el análisis estadístico del ratio de los diámetros de las réplicas, normalizados con el blanco, en cada uno de los papeles ensayados en el test del RC.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico *SPSS versión 26.0 (Armonk, NY, USA)*. Los resultados de las variables cualitativas se expresaron en porcentaje. Las variables cuantitativas se evaluaron por comparación de medias, utilizando la prueba “*t de Student*” o “*U de Mann Whitney*”, y los resultados se expresaron con la media y la desviación estándar. La normalidad se estudió con la prueba de *Shapiro-Wilk*, ya que en ningún grupo el tamaño muestral supera los 50, y se utilizó un nivel de significación estadística de 0.05 para todos los test estadísticos aplicados.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para conocer las características de la población de estudio se realizó un análisis estadístico descriptivo, el cual se encuentra recogido en las tablas del anexo III.

En la primera tabla se recoge la información de las variables cuantitativas. Los tres grupos estudiados se encuentran dentro de un mismo rango de edad, observándose una media de edad de 30,2 (8,27) en no gestantes, de 33,77 (5,6) en gestantes sin PE y de 32,69 (6,67) en el grupo que integra a las mujeres que desarrollan PE.

El grupo de preeclampsia se define en una edad gestacional más avanzada. Además, las tensiones arteriales registradas en el grupo de PE son más elevadas que en una gestación normal, tal y como se esperaría en esta patología (1–4). Por otro lado, las variaciones en el peso son notables, posiblemente debido a la diferencia de edad gestacional de las gestantes sin patología y las gestantes con PE, estando éstas últimas de media 10 semanas por delante.

La última tabla del anexo III presenta los porcentajes para aquellas variables cualitativas. Observando la columna de gestantes con PE, se describe el 100% de las mujeres de este grupo en el último trimestre del embarazo, y casi la mitad son nulíparas. Además, existe un pequeño porcentaje (7,69%) que ha acudido a técnicas de fecundación in vitro para lograr el embarazo y el 15,38% presentan un embarazo gemelar, a diferencia del grupo de gestantes sin patología. Estos factores se consideran de riesgo en el desarrollo de PE (17).

6.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

6.2.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN EL EMBARAZO Y SUS COMPLICACIONES

Parámetros	N = tamaño muestral Media (desviación estándar)			P-valor
	Gestantes sin patología	Gestantes con PE	Gestantes con HTA	Sin patología vs PE Sin patología vs HTA PE vs HTA
Tasa de filtrado glomerular (TFG) (mL/min/1,73m ²)	N = 13 127,37 (11,2)	N = 13 110,75 (18,49)	N = 9 119,69 (10,67)	0,011 0,123 0,208
Creatinina sérica (mg/dL)	N = 14 0,53 (0,09)	N = 13 0,70 (0,15)	N = 9 0,57 (0,11)	0,001 0,378 0,04
Ácido úrico en sangre (mg/dL)	N = 14 3,39 (0,59)	N = 6 6,23 (1,3)	N = 4 4,14 (1,02)	0,001 0,203 0,019

Tabla 1.- Resultados del análisis estadístico para parámetros relacionados con la función glomerular y representación del p-valor por comparación entre los grupos de gestantes, siendo el nivel de significación un 5%.

– Valoración de la tasa de filtrado glomerular

La tasa de filtrado glomerular (TFG) evalúa la cantidad de sangre que se filtra por minuto en el glomérulo renal y por tanto refleja el correcto funcionamiento de los riñones. Se estima a través de una fórmula matemática (ecuación CKD-EPI) que incluye entre sus factores la creatinina sérica (18).

En la tabla 1 se analizan tres grupos de gestantes. Teniendo en cuenta que durante el embarazo existe hiperfiltración renal, sería esperable obtener valores similares de la TFG entre ellos (4,14,15). Sin embargo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las medias de la TFG entre los grupos de gestantes sin patología y gestantes con PE, concluyendo que **en presencia de preeclampsia la TFG se ve disminuida**, coincidiendo así con otros estudios (19). Sin embargo, no hubo diferencias significativas con las pacientes que solo desarrollaron HTA durante el embarazo, y tampoco se observaron en este grupo de gestantes valores tan elevados de filtración como los que se esperarían en pacientes gestantes sin patología.

Todo ello permite plantear la siguiente hipótesis. Durante un episodio de PE, dado el reclutamiento de VEGF por sFlt-1, la producción de ON disminuye, elevando la tensión arterial y la resistencia renal. Además, es de interés proponer que en gestantes con HTA, por su propia patología, surja una contribución al aumento de la resistencia renal, ya que en estos casos el sistema renina-angiotensina-aldosterona no es capaz de controlar la situación (4). Así se podrían explicar los niveles inferiores de la TFG en gestantes con HTA frente a gestantes sin patología, sin llegar a descender lo suficiente como para igualar a las gestantes con PE, ya que al cursar una gestación con HTA no ocurre el reclutamiento de VEGF. Se requiere más investigación para conocer si cabría esta posibilidad.

Por otro lado, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de **creatinina sérica y ácido úrico** entre los grupos de gestantes sin patología y gestantes con PE, y entre gestantes con HTA y gestantes con PE, **siendo mayor la media de ambos parámetros en el grupo de gestantes con PE.**

Estos resultados nos llevan a plantear la posibilidad de que la presencia de PE estuviera provocando una afección estructural o funcional en el riñón, explicándose así la disminución de la TFG en gestantes con PE y la acumulación de creatinina y ácido úrico en sangre, coincidiendo con otros estudios (16). Sin embargo, según los valores presentes en las guías clínicas (12,20), una TFG ≤ 90 mL/min/1,73m² es indicativo de disminución de la función renal y lesión renal. Como ya hemos mencionado, la TFG aumenta durante el embarazo y una lesión renal podría no ser correctamente valorada en embarazadas, lo que nos lleva a pensar que el punto de corte para determinar una lesión renal en gestantes no debería ser el mismo que para el resto de la población, concluyendo que sería necesario incluir un factor de corrección o modificar los puntos de corte para embarazadas.

– **Quantificación de glucosa y proteínas en orina**

Parámetros	N = tamaño muestral Media (desviación estándar)			P-valor
	Gestantes sin PE	Gestantes con PE	No gestantes	Gestantes vs PE Gestantes vs no gestantes PE vs no gestantes
Glucosa en orina (g/L)	N = 26 0,054 (0,19)	N = 11 0,064 (0,21)	N = 13 0,038 (0,13)	0,888 0,949 0,856
Proteínas cuantificadas en orina (g/L)	N = 26 0,127 (0,08)	N = 13 4,4 (4,92)	N = 13 0,03 (0,07)	< 0,001 0,001 0,007
Volumen hídrico corporal (%)	N = 26 38,096 (6,72)	N = 9 41,77 (15,27)	N = 15 29,55 (3,79)	0,910 < 0,001 0,044
Sodio en orina (mEq/L)	N = 20 102,45 (47,98)	N = 4 60,95 (34,76)	N = 15 95,36 (33,19)	0,117 0,627 0,085
Potasio en orina (mEq/L)	N = 21 44,70 (28,9)	N = 4 61 (39,8)	N = 15 89,30 (36)	0,459 < 0,001 0,188
Cloro en orina (mEq/L)	N = 21 107,18 (45,50)	N = 4 77,17 (40,79)	N = 15 146,56 (58,13)	0,233 0,029 0,040
Osmolalidad en orina (mOsm/kg)	N = 24 826,5 (454,09)	N = 5 581,80 (260,74)	N = 15 831,67 (293,32)	0,386 0,644 0,108

Tabla 2.-Resultados del análisis estadístico para parámetros relacionados con la función renal y representación del p-valor por comparación entre mujeres no gestantes y dos grupos de gestantes con y sin PE, siendo el nivel de significación un 5%.

Tras el análisis estadístico de los resultados contenidos en la tabla 2 se observó que **no aparecían diferencias significativas en la concentración de glucosa en la orina de los grupos estudiados**. Según varios estudios, en gestantes se esperarían encontrar niveles aumentados de glucosa en orina a consecuencia de la hiperfiltración glomerular, provocados por una adaptación del sistema renal en la que además disminuye la expresión de los transportadores de glucosa reduciendo su captación en el túbulo renal (14,15).

Con respecto a las proteínas, se observan diferencias significativas entre los tres grupos comparados. En las embarazadas aumenta la media de proteínas cuantificadas en orina en comparación con mujeres no embarazadas y este valor es muy superior en el caso de mujeres que desarrollan preeclampsia en su embarazo. Estos resultados se encuentran dentro de lo esperable según la bibliografía consultada (1-3,14,15). Por tanto, **en condiciones normales no se observa proteína en orina**, mientras que, **en la gestación, a causa de la hiperfiltración glomerular, su concentración se ve aumentada**. Además, en la PE se obtuvieron niveles de proteinuria, característicos de la misma patología, que guardarían cierta relación con el daño renal que se puede estar produciendo.

– Volumen hídrico corporal

Tras observar los resultados contenidos en la tabla 2, aparecían diferencias relevantes entre las no gestantes y las gestantes, independientemente de si presentaban patología o no. El embarazo consiste en una situación donde se retiene una gran cantidad de agua, produciéndose un incremento constante del volumen corporal a lo largo de los 9 meses de gestación (15). Estos resultados permitieron sugerir que **la PE no interfiere en el volumen de agua que se retiene en el embarazo**.

– Análisis de electrolitos urinarios

En nuestro estudio no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para los valores de sodio en orina, a pesar de que son ligeramente superiores en gestantes que en no gestantes, lo que llevaría a pensar que el embarazo es una situación donde se excreta sodio, seguramente gracias a la hiperfiltración y a la regulación hormonal de la gestación. Mientras tanto, en la PE, los niveles estaban muy disminuidos, seguramente a consecuencia del posible daño renal presente en la patología y de la probable disminución de los niveles de progesterona. Con respecto a los resultados iónicos, existen artículos que defienden que durante el embarazo los niveles de aldosterona llegan a duplicarse, contribuyendo a la reabsorción de sodio para evitar su pérdida (14). Por otro lado, hay estudios que defienden que la hormona antidiurética (ADH) presenta niveles elevados durante el embarazo, a consecuencia de la disminución inicial de la tensión arterial, contribuyendo a una mayor excreción de sodio, al igual que la progesterona se encuentra en concentraciones elevadas a consecuencia de su producción por la placenta, y tiende a inhibir la retención del sodio por la aldosterona (15).

La concentración de potasio en orina presentó diferencias significativas entre las gestantes sanas y las no gestantes. De hecho, fue un resultado esperable teniendo en cuenta que durante la gestación se acumula una gran cantidad del mismo en el espacio fetal a consecuencia de los elevados niveles de progesterona, lo que explicaría su disminución en orina (14,15). Además, **no se observaron resultados significativos con las gestantes con PE**, pero podría explicarse por el descenso en los niveles de progesterona en la PE, que llevaría a acumular una cantidad inferior de potasio en el espacio fetal (14). Por otro lado, **la concentración de cloro en orina tuvo significación entre las no gestantes y las**

gestantes sin patología y, a su vez, entre las no gestantes y las gestantes con PE, presentando una **concentración muy superior en el grupo de pacientes no gestantes**. No se encontraron estudios capaces de justificar los resultados obtenidos, pero tras su interpretación se dedujo que la PE no provoca variaciones en la concentración iónica de cloro en orina más allá que las que conlleva un embarazo común.

La osmolalidad urinaria mide el número de partículas disueltas en la orina, y fluctúa continuamente con el objetivo de ir corrigiendo los posibles desequilibrios hídricos. Un aumento de la diuresis con disminución de la osmolalidad urinaria puede explicarse porque el organismo está intentando eliminar el exceso de líquidos o porque existe una incapacidad para concentrar la orina. **No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, pero el grupo con preeclampsia tiene una osmolalidad ligeramente inferior al resto, sugiriendo que la orina de estas pacientes podría estar más diluida**. Los iones son responsables de la concentración y osmolalidad final de la orina, y se reabsorben principalmente en el túbulo distal, donde fisiológicamente se sitúan numerosos transportadores activos y es la parte más susceptible a la acción del sistema endocrino. En esta región se produce la reabsorción de agua mediada por la hormona ADH y en este segmento ejerce su acción la aldosterona, potenciando la acción de la bomba $Na^+/K^+/ATPasa$, excretando sodio y reabsorbiendo potasio desde el intersticio; el cotransportador Na^+/Cl^- , para promover la reabsorción de sodio a contracorriente del cloro desde el lumen; y el canal epitelial de sodio, el cuál favorece la reabsorción de sodio desde el espacio luminal (21). Una mayor actividad de la aldosterona y/o menor actividad de la ADH en esta región explicaría los niveles de iones en la orina de pacientes con PE y el consiguiente descenso en la osmolalidad.

6.2.2 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL EN LA PREECLAMPSIA SEGÚN SU GRAVEDAD

Resultó interesante comparar los resultados de cada parámetro en función de la gravedad de la patología con las gestantes sanas. De este modo, se pudo obtener información dependiente de la gravedad de la enfermedad, a pesar de lo limitada que quedó la estadística por la disminución del tamaño muestral tras desglosar el grupo de gestantes con PE.

Coincidiendo con las conjeturas planteadas para la tabla 2, en la tabla 3 se encontraron **diferencias significativas en la cuantificación proteica entre gestantes sin patología y gestantes con PE grave, siendo mayor el contenido proteico en estas últimas**. Este resultado este avalado en varios estudios por definición de la propia enfermedad (1–3,14,15). Sin embargo, entre las consecutivas formas de gravedad de la enfermedad, o incluso entre la forma leve y las gestantes no patológicas, no se obtuvieron resultados significativos, tal vez por la limitación ya comentada del tamaño muestral en el grupo de PE leve.

Tras valorar los estadísticos obtenidos para el volumen corporal, no se encontraron resultados relevantes entre las diversas formas de la patología y la gestación normal. Estos datos enfatizaron la idea de que **la PE no interfiere en el desarrollo gestacional perturbando el volumen hídrico corporal** de la gestante, permitiendo así el aumento de peso a lo largo del embarazo (15).

Por último, **no se observaron diferencias significativas a nivel iónico entre los diversos grupos**, muy posiblemente debido a la limitación del tamaño muestral.

Parámetros	N = tamaño muestral Media (desviación estándar)			P-valor
	Gestantes sin PE	Gestantes con PE leve	Gestantes con PE grave	PE leve vs PE grave PE leve vs gestantes PE grave vs gestantes
Proteínas cuantificadas en orina (g/L)	N = 26 0,127 (0,089)	N = 4 1,153 (0,71)	N = 9 5,88 (5,32)	0,064 0,064 < 0,001
Volumen hídrico corporal (%)	N = 26 38,096 (6,72)	N = 2 35,45 (2,47)	N = 7 43,50 (17,16)	0,883 0,721 0,965
Sodio en orina (mEq/L)	N = 20 102,45 (47,98)	N = 1 Cte (22,5)	N = 3 73,76 (28,76)	0,180 0,099 0,361
Potasio en orina (mEq/L)	N = 21 44,77 (28,9)	N = 1 Cte (113,2)	N = 3 43,6 (23,67)	0,180 0,134 0,965
Cloro en orina (mEq/L)	N = 21 107,18 (45,50)	N = 1 Cte (34,2)	N = 3 91,5 (35,5)	0,180 0,134 0,631

Tabla 3.- Resultados del análisis estadístico para los parámetros relacionados con la función renal y representación del p-valor por comparación entre la gravedad de la enfermedad, siendo el nivel de significación un 5%.

Parámetros	N = tamaño muestral Media (desviación estándar)			P-valor
	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre	1º vs 2º 1º vs 3º 2º vs 3º
Proteínas cuantificadas en orina (g/L)	N = 5 0,11 (0,05)	N = 8 0,13 (0,11)	N = 13 0,12 (0,078)	0,737 0,686 0,950

Tabla 4.- Resultados del análisis estadístico de la cuantificación proteica en orina en el grupo de gestantes sin PE y representación del p-valor por comparación entre los trimestres del embarazo, siendo el nivel de significación un 5%.

Finalmente, valorando los resultados que se obtuvieron en este estudio, y que se encuentran representados en la tabla 4, se observa que **no existen diferencias significativas en el contenido proteico a lo largo de los trimestres en un embarazo sin PE**, contrastando la información de otros estudios, los cuáles defienden que el aumento en el contenido proteico durante el embarazo se observa al comparar el inicio y el final del mismo (14).

6.3 TEST DE DETECCIÓN BASADO EN EL COLORANTE ROJO CONGO

La puesta a punto de la técnica se realizó con muestras de voluntarias pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio. Estas muestras fueron tratadas mediante un proceso de congelación por gradiente y descongelación directa para minimizar la pérdida de proteína total en la muestra por afectación del proceso de congelación (22). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos procesos sobre muestras de orina no están bien conocidos (12).

Tras realizar los cambios necesarios con respecto al protocolo inicial y adaptar el método al laboratorio de trabajo, se repitió el test con las mismas muestras, sin poder realizarse el duplicado por carencia de muestra y obteniéndose los resultados representados en la Ilustración 1.

Para evaluar la eficacia de cada papel, se calculó ratio del diámetro de la muestra con respecto al del blanco, tomando como medida el mayor diámetro en cualquier dirección. Cuanto más se aproxime este valor al 1, más se asemejará al blanco, y con ello se podrá inferir la ausencia de proteínas en la muestra. Por el contrario, si está por encima de 1, pondrá de manifiesto la presencia de agregados de proteínas. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

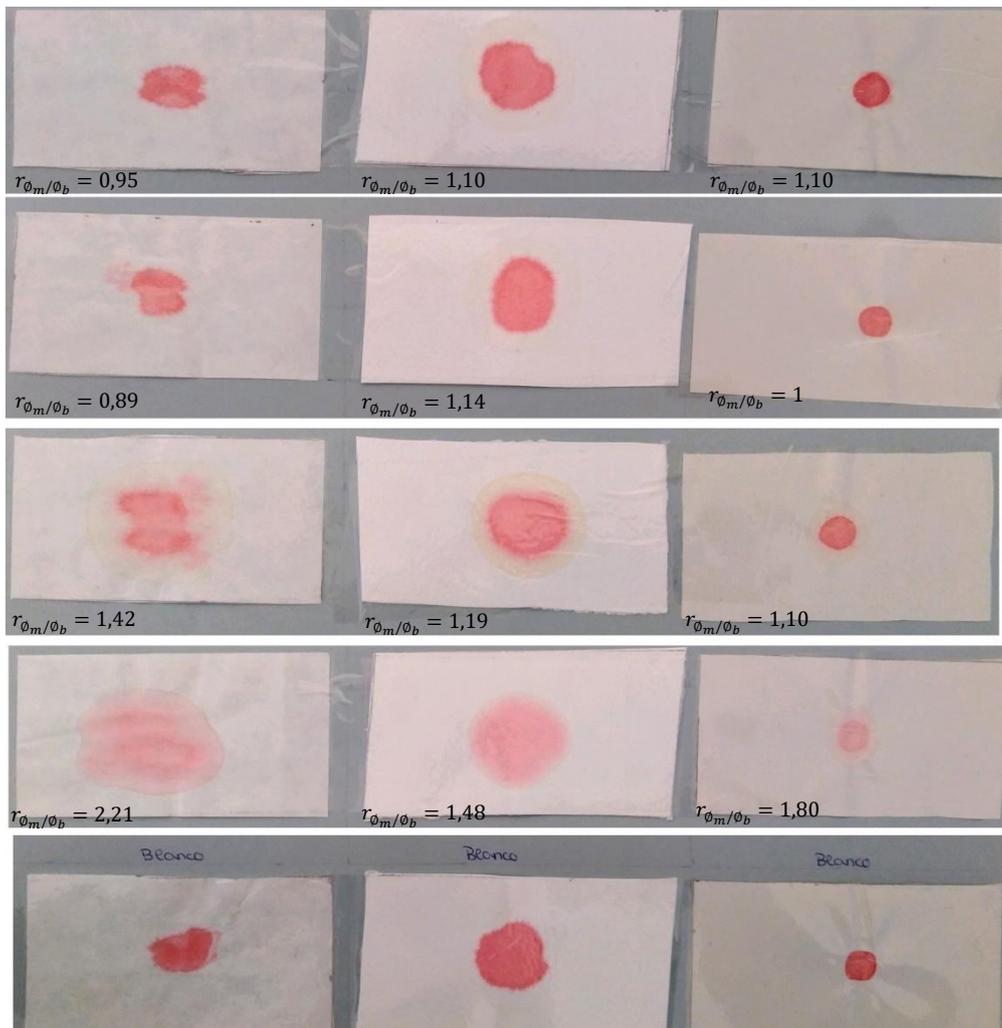


Ilustración 1.- Resultados obtenidos con la técnica basada en RC. Por filas descendentes encontramos: embarazo sin patología - embarazo con HTA - embarazo con PE leve - embarazo con PE grave - Blanco. Por columnas consecutivas encontramos: papel dorsan living filtration – papel Whatman – papel Trendwhite.

- **Embarazo sin patología y blanco:** se observa la misma distribución del colorante en el blanco que sobre la muestra de orina. Coincide con lo esperado tras conocer su diagnóstico médico.
- **Embarazo con HTA:** no hay diferencias relevantes visualmente, pues se trata de una paciente gestante que presentó hipertensión sin proteínas en la orina. El resultado coincide con lo esperado tras conocer su diagnóstico.
- **Embarazo con PE leve:** en este caso si había proteínas en la orina (0,952 g/L). Lo esperable sería obtener un diámetro mayor, además de una menor intensidad del color. Este incremento en el diámetro se observa principalmente en el papel *dorsan living filtration*, con un ratio de 1,42. Además, se aprecia una pequeña disminución en la tonalidad, aunque no se perciba de forma tan clara como en la PE grave.
- **Embarazo con PE grave:** Esta paciente presentó una concentración proteica urinaria de 5,78 g/L. En la ilustración 1 se observa que la intensidad del color disminuyó, como era de esperar debido a la menor disponibilidad del colorante RC libre. Además, se observó que, con respecto al blanco, el papel *dorsan living filtration* maximiza las diferencias de diámetro, a pesar de que su distribución no es tan homogénea como ocurre con los otros papeles ensayados. Por otro lado, se observó que el papel *trendwhite* no queda bien definido, sino que aparece con un halo rojizo a su alrededor, que se entiende que es parte del colorante unido a las proteínas intentando avanzar, por lo que también muestra un incremento en el diámetro con respecto al blanco. Por último, el papel *Whatman* mantuvo la integridad de la circunferencia, desplazándose de forma equitativa alrededor de la zona en la que se había depositado la gota, a pesar de ser el que menos maximiza las diferencias de diámetro.

Es una técnica que depende totalmente del contenido proteico de la muestra. Además, con los resultados obtenidos, deducimos que **el papel *Whatman*, económicamente menos asequible, no maximiza las diferencias de diámetro con respecto al blanco tanto como el papel *dorsan*, de un precio mucho inferior.** En este estudio se midió la distancia que es capaz de avanzar la muestra, inversamente proporcional a la cantidad de RC libre y directamente proporcional a la concentración proteica, asique podemos afirmar que el papel más apto para esta técnica es *dorsan living filtration*.

Tras valorar los resultados visualmente, podríamos concluir que esta técnica permite diferenciar la PE en su forma más grave de un embarazo no patológico. Sin embargo, al estar ligada al contenido proteico, es una conclusión que también se puede obtener de la cuantificación proteica. Aun así, tras realizar un análisis estadístico del ratio obtenido en cada tipo de papel con respecto a cada grupo, no se obtuvieron resultados significativos. Esto pudo deberse a la principal limitación del estudio, el tamaño muestral. Por todo ello, concluimos que **es una técnica de detección rápida en patologías donde el contenido proteico en orina es elevado, pero no se puede confirmar su uso para predecir episodios de PE, a falta de más investigación.**

A continuación, en la ilustración 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis de 2 muestras de orina de la misma paciente, con 18,45 g/L y, 5 días más tarde, con 12,78 g/L de proteínas. Todo ello acompañado de hipertensión, por lo que el diagnóstico definitivo fue de PE grave.

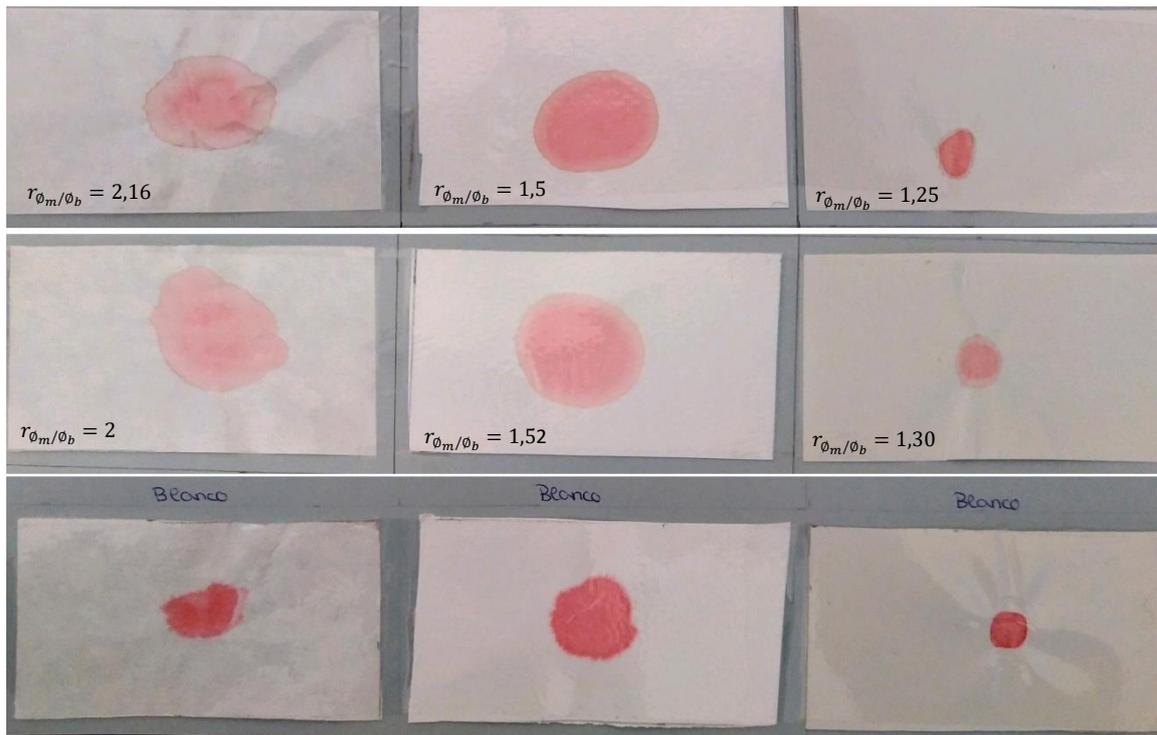


Ilustración 2.- Test RC aplicado sobre dos muestras de orina de la misma paciente. En la primera fila se encuentra la muestra con una concentración proteica de 18,45 g/L, mientras que en la segunda fila se encuentra la muestra con 12,78 g/L de proteínas, tomada 5 días más tarde. Por último, en la tercera fila se encuentra el blanco.

A pesar de los cambios visuales que podemos intuir, o las diferencias en el contenido proteico que conocemos, no se observan diferencias significativas entre los ratios de ambas muestras. Esto nos permitió postular que, **una vez alcanzado un límite proteico, el diámetro de la marca deja de variar al igual que la tonalidad y, por tanto, no está directamente relacionado con el aumento del contenido proteico.**

Finalmente, en la ilustración 3 ([anexo IV](#)) se pretende mostrar la misma técnica aplicada sobre una paciente con enfermedad renal crónica (ERC) con 6,23 g/L de proteínas en la orina. Debido a la patología que presenta, las proteínas se filtran a través del glomérulo y se detectan en orina. Como consecuencia, se observa el cambio de color hacia rosado provocado por la presencia de las proteínas en la muestra de orina. Esto permitió confirmar que **padecer ERC es un factor que puede provocar interferencias en el desarrollo del test**, además de proponer que la congofilia puede observarse en otras patologías que cursan con aumento de proteínas en orina, dependiendo así de la presencia de proteínas en la orina y de la conformación que tengan.

7 CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos y, valorando los objetivos planteados en el comienzo del proyecto, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. La PE conlleva disminución de la TFG en comparación con el embarazo sin PE, que podría estar en relación con el desarrollo de una **lesión estructural/funcional renal**, valorándose así la

necesidad de ajustar los valores de la TFG en población gestante para identificar la patología renal.

2. En la PE, la disminución de la TFG conlleva el **acúmulo de creatinina y ácido úrico** en sangre.
3. La concentración de **glucosa en la orina no presenta variaciones durante el embarazo**, aún en presencia de PE.
4. Existe una situación de hiperfiltración durante el embarazo que condiciona adaptaciones de la función tubular. Se observa **eficacia del equilibrio glomérulo-tubular para conservar un adecuado balance de sodio**.
5. Los niveles de cloro y potasio urinarios disminuyen durante el embarazo, mientras el sodio y la osmolalidad urinaria no presentan variaciones. **Durante un episodio de PE los niveles de cloro, sodio y osmolalidad urinaria son más bajos que lo esperado en un embarazo sin complicaciones**, observando diferencias significativas solo en el cloro. No se observaron diferencias en el balance iónico en función de la gravedad.
6. **El volumen de agua corporal no registra variaciones en el embarazo**, a pesar de que el descenso de osmolalidad urinaria en PE sugiere una pérdida de agua a través de la orina.
7. La **proteinuria es una característica fundamental en los fenómenos de PE**, considerándose un factor indicador de gravedad.
8. **La técnica basada en RC permite detectar proteínas en la orina de pacientes que presentan PE**. Se puede aplicar como técnica complementaria a las rutinarias o incluso puede servir como técnica básica de detección proteica urinaria en lugares donde los recursos estén más limitados. Se requiere más investigación para conocer si es una técnica útil en diagnóstico precoz.
9. **El papel *dorsan living filtration* es el óptimo para el desarrollo de la técnica basada en RC**, debido a su precio y a la capacidad de maximizar las diferencias de diámetro con respecto a los otros papeles ensayados.
10. **La técnica basada en RC presenta un umbral de saturación para la concentración proteica urinaria**. Una vez alcanzado, el diámetro de la marca y la intensidad del color dejan de variar.

8 CONCLUSIONS

After analyzing the results obtained and evaluating the objectives set at the beginning of the project, the following conclusions have been reached:

1. PE leads to decreased TFG compared to PE-free pregnancy, which could be in relation to the development of a **renal structural/functional injury**, thus rated the need to adjust the values of GFR in the pregnant population to identify renal pathology.
2. In PE, the decrease in GFR leads to the **accumulation of creatinine and uric acid** in the blood.
3. **The glucose concentration in the urine does not show variations during pregnancy**, even in the presence of PE.
4. There is a situation of hyperfiltration during pregnancy that conditions adaptations of tubular function. **Glomerulo-tubular balance is effective in maintaining an adequate sodium balance**.
5. Urinary chlorine and potassium levels decrease during pregnancy, while urinary sodium and osmolality do not show variations. During an episode of PE, **the levels of chlorine, sodium and urinary osmolality are lower than expected in an uncomplicated pregnancy**, observing

significant differences only in chlorine. No differences were observed in ion balance as a function of gravity.

6. **The volume of body water does not register changes in pregnancy**, despite the fact that the decrease in urinary osmolality in PE suggests a loss of water through the urine.
7. **Proteinuria is a fundamental characteristic in PE**, being considered an indicator of severity.
8. **The CR-based technique allows the detection of proteins in the urine of patients with PE**. It can be applied as a complementary technique to the routine ones or it can even serve as a basic urinary protein detection technique in places where resources are more limited. More research is required to know if it is a useful technique in early diagnosis.
9. **The dorsan living** filtration paper is optimal for the development of the RC-based technique, due to its price and the ability to maximize the differences in diameter with respect to the other papers tested.
10. **The RC-based technique has a saturation threshold for urinary protein concentration**. Once reached, the diameter of the mark and the intensity of the color cease to vary.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Starodubtseva N, Nizyaeva N, Baev O, Bugrova A, Gapaeva M, Muminova K, et al. SERPINA1 peptides in urine as a potential marker of preeclampsia severity. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1–15.
2. Gerasimova EM, Fedotov SA, Kachkin D V, Vashukova ES, Glotov AS, Chernoff YO, et al. Protein misfolding during pregnancy: New approaches to preeclampsia diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):1-18.
3. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Trastornos hipertensivos del embarazo - Guía práctica asistencial. 2006;1–14.
4. Otero Gonzalez A. Embarazo y Riñon. *Nefrología al día*. 2020;1–52.
5. Lecarpentier E, Tsatsaris V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. *Ann Endocrinol*. 2016;77(2):97–100.
6. Brennecke SP et al. Predictive Value of the sFlt-1: PlGF Ratio in Women With Suspected Preeclampsia. *NEJM*. 2016; 374:13–22.
7. Buhimschi IA, Nayeri UA, Zhao G, Shook LL, Pensalfini A, Funai EF, et al. Defective Amyloid Processing in Preeclampsia. *Sci Transl Med*. 2014;6(245):245–92.
8. Bateman A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D506–15.
9. Rood KM, Buhimschi CS, Dible T, Webster S, Zhao G, Samuels P, et al. Congo Red Dot Paper Test for Antenatal Triage and Rapid Identification of Preeclampsia. *EclinicalMedicine*. 2019;8:47–56.
10. García de Guadiana Romualdo L, Martínez Uriarte J, González Morales M, López Pérez R, Hernández Salinas FJ, Martín García E, et al. Evaluación del índice proteína-creatinina en orina

- aislada para la predicción de proteinuria significativa durante la gestación. *Progresos Obstet y Ginecol.* 2011;54(5):225–230.
11. Montero N, José Soler M, José Pascual M, Barrios C, Márquez E, Rodríguez E, et al. Correlación entre el cociente proteína/creatinina en orina esporádica y las proteínas en orina de 24 horas. *Nefrología.* 2012;32(4):494–501.
 12. Bermúdez RM, García SG, Surribas DP, Castelao AM, Sanjuán JB. Documento de Consenso - Recomendaciones sobre la valoración de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología.* 2011;31(3):331–345.
 13. Rood KM, Buhimschi CS, Rn TD, Rn SW, Zhao G, Samuels P, et al. Congo Red Dot Paper Test for Antenatal Triage and Rapid Identification of Preeclampsia - Supplementary Appendix. *EClinicalMedicine.* 2019;8:1–11.
 14. Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, Landon MB, Galan HL, Jauniaux ERM et al. *Obstetrics: normal and problem pregnancies.* Vol 53. 7ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2019.
 15. Gallo JL, Padilla MC. Función renal en el embarazo. *Rev Mex Urol.* 2000;27(2):56–61.
 16. Durán Alcaraz CL, Reyes-Paredes N. Enfermedades Renales y Embarazo. *Rev Hosp M Gea Glz.* 2006;7(2):82–89.
 17. Rencoret G. Embarazo gemelar. *Rev Med Clin Condes.* 2014;25(6):964–971.
 18. Bermúdez RM, Sanjuán JB, Samper AO, Castán JAB, García SG. Valoración de la nueva ecuación CKD-EPI para la estimación del filtrado glomerular. *Nefrología.* 2010;30(2): 185-194.
 19. Krutzén E, Olofsson P, Bäck S, Nilsson-Ehle P. Glomerular filtration rate in pregnancy: a study in normal subjects and in patients with hypertension, preeclampsia and diabetes. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;52:387-392.
 20. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Detección y el Manejo de la Enfermedad Renal Crónica. *Guía de Práctica Clínica sobre la Detección y el Manejo de la Enfermedad Renal Crónica.* Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2016.
 21. Gonzalez-Núñez D. Poch E. Aldosterona: aspectos fisiopatológicos fundamentales y nuevos mecanismos de acción en la nefrona distal. *Nefrología.* 2006;26(3):291–303.
 22. Zhang Y, Luo Y, Lu H, Wang N, Shen Y, Chen R, et al. Effect of freeze/thaw cycles on several biomarkers in urine from patients with kidney disease. *Biopreserv Biobank.* 2015;13(2):144–146.