



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Marcadores genéticos como
variables instrumentales para
establecer el efecto causal del Ácido
Úrico en Preeclampsia, mediante un
análisis de Randomización
mendeliana en gestantes
colombianas**

Claudia Carolina Colmenares Mejía, MD.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Clínicas
Bogotá, Colombia
2017

Marcadores genéticos como variables instrumentales para establecer el efecto causal del Ácido Úrico en Preeclampsia, mediante un análisis de Randomización mendeliana en gestantes colombianas

Claudia Carolina Colmenares Mejía

Tesis presentada como requisito parcial para el título de:

Magíster en Epidemiología Clínica

Director:

MD. PhD. Juan Pablo Casas Romero

London School of Hygiene and Tropical Medicine. Reino Unido

MD. MSc. PhD. Javier Hernando Eslava Schmalbach,

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Línea de investigación: Genética de la Preeclampsia – Marcadores séricos de enfermedades complejas

Grupo de investigación: Estudio Genético de Enfermedades Complejas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Clínicas
Bogotá, Colombia
2017

Dedicatoria

Gracias a Dios, a mis padres y abuelos por acompañarme en el camino de la vida.

Agradecimientos

A mis docentes de la maestría en epidemiología clínica de la Universidad Nacional de Colombia por enseñarme el análisis crítico de la investigación.

Al grupo de investigación *Estudio Genético de Enfermedades Complejas*, quienes siempre han sido parte vital de mi proceso investigativo, especialmente en el área de la genética y preeclampsia. A Juan Pablo Casas Romero y Eleonora Staines-Urias en *London School of Hygiene and Tropical Medicine* por recibirme y enseñarme a ver más allá de los datos.

A las gestantes participantes del estudio quienes nos permitieron conocer un poco más acerca de ésta enfermedad, a través del análisis en sus muestras biológicas.

Resumen

Objetivo: Estimar el potencial efecto causal del ácido úrico sobre la presencia de Preeclampsia, utilizando variables instrumentales genéticas identificadas en estudios ampliados del genoma, a través de un análisis de Randomización mendeliana en gestantes colombianas captadas entre 2000 y 2012 en 8 ciudades del país.

Metodología: Estudio analítico de casos y controles. A partir de la base de datos del estudio GenPE, se realizó un análisis observacional para evaluar el efecto del ácido úrico sobre la preeclampsia a través de regresión logística ajustada. Posteriormente, se construyó un score genético que fue utilizado como variable instrumental para obtener un OR e IC95% como estimador causal en el contexto del análisis de Randomización mendeliana mediante el método de dos etapas.

Resultados: 3.251 participantes fueron incluidas en el análisis observacional. Se reportó un OR ajustado de 1.16 (IC95% 1.09-1.25) para preeclampsia por el aumento de 1 mg de ácido úrico. Se utilizó un score genético de 20 SNP's como variable instrumental. El análisis de Randomización mendeliana incluyó 2.715 gestantes y reportó un OR de 0.73 (IC95% 0.49 – 1.10) y 0.84 (IC95% 0.60 – 1.18) para preeclampsia por el aumento de una unidad los valores estimados de ácido úrico con el score genético ponderado por peso externo e interno, respectivamente.

Conclusiones: A partir de los resultados obtenidos no fue posible establecer un efecto causal del ácido úrico sobre la preeclampsia en gestantes colombianas. Estudios con mayores tamaños de muestra deben ser realizados para confirmar los hallazgos aquí reportados.

Palabras clave: Ácido úrico, Preeclampsia, Randomización Mendeliana

Abstract

Aim: To estimate the potential causal effect of the uric acid on Preeclampsia, using genetic markers as instrumental variables in a Mendelian Randomization analysis of Colombian pregnant women recruited between 2000 and 2012 in eight cities.

Methodology: Case control study. From the database of GenPE study, an observational analysis was done to assess the effect of uric acid levels on preeclampsia through adjusted logistic regression. For Mendelian Randomization analysis, a weighted genetic score was used as instrumental variable to obtain a causal OR and CI95%. This analysis was performed using the two-step method.

Results: 3.251 participants were included in the observational analysis. It was estimated an OR of 1.16 (IC95 % 1.09-1.25) for preeclampsia by the increase of 1 mg of uric acid. A genetic score of 20 SNP's was built as instrumental variable. The analysis of Mendelian Randomization included 2.715 pregnant women and estimated an OR 0.73 (CI9 % 0.49 - 1.10) and 0.84 (IC95 % 0.60 - 1.18) for preeclampsia by the increase of 1 unit of estimated values of uric acid with external and internal weighted genetic score, respectively.

Conclusions: From these results, it was not possible to establish a causal effect of the uric acid on preeclampsia in Colombian pregnant women. Studies with major sample sizes must be realized to confirm the findings in this study.

Keywords: Uric acid, Pre-eclampsia, Mendelian Randomization

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	15
Introducción	17
1. Planteamiento del problema	20
1.1 Pregunta de investigación.....	26
1.2 Justificación	27
2. Marco de referencia	29
2.1 Carga de la enfermedad	29
2.2 Fisiopatología de la preeclampsia	32
2.2.1 Componente materno	33
2.2.2 Componente placentario	33
2.3 Ácido Úrico.....	34
2.3.1 Ácido úrico en el embarazo normal.....	38
2.3.2 Ácido úrico y Preeclampsia.....	38
2.4 Epidemiología genética.....	40
2.4.1 Estudios ampliados del genoma en ácido úrico.....	42
2.5 Randomización Mendeliana.....	44
2.5.1 Variables instrumentales.....	47
2.6 Estudio GenPE	56
3. Objetivos	59
3.1 Objetivo general.....	59
3.2 Objetivos específicos	59
4. Metodología	60
4.1 Diseño.....	60
4.2 Población	60
4.2.1 Criterios de inclusión.....	61
4.2.2 Criterios de exclusión.....	61
4.2.3 Muestra	61
4.3 Medición de ácido úrico	63
4.4 Genotipificación	63

4.5	Variables.....	64
4.6	Análisis estadístico	65
4.6.1	Componente observacional	65
4.6.2	Componente genético.....	66
5.	Resultados	71
5.1	Componente observacional	73
5.2	Componente genético.....	80
6.	Conclusiones	98
Anexo 1: Consentimiento informado Proyecto GenPE.....		101
Anexo 2: Relación funcional entre el desenlace y la exposición en el modelo de regresión logística.....		104
Anexo 3: Construcción del modelo de regresión logística		106
Anexo 4: SNP's reportados en la literatura de acuerdo al origen étnico		110
Bibliografía		115

Lista de figuras

Figura 2-1. Proporción de muertes maternas por Trastornos Hipertensivos del embarazo a nivel mundial.....	30
Figura 2-2. Porcentaje de muertes maternas secundarias a Trastornos Hipertensivos del Embarazo en Colombia entre 2000 y 2012	31
Figura 2-3. Excreción renal de ácido úrico	35
Figura 2-4. Productos derivados del ácido úrico en presencia de otros oxidantes.....	37
Figura 2-5 Manhattan plot de GWAS sobre ácido úrico en población caucásica	44
Figura 2-6. Comparación entre ensayos clínicos y Randomización mendeliana	46
Figura 2-7. Asunciones de la variable instrumental.....	48
Figura 2-8. Gráfico directo acíclico sobre la asociación entre ácido úrico y preeclampsia utilizando marcadores genéticos como variables instrumentales.....	48
Figura 2-9. Comparación del efecto (observacional vs genético) de los niveles de PCR y la enfermedad coronaria.....	51
Figura 2-10. Comparación del efecto (observacional y genético) del ácido úrico en la enfermedad coronaria.....	52
Figura 2-11. Descripción del Equilibrio de ligamiento.....	54
Figura 5-1. Flujograma de pacientes incluidas en el análisis de ácido úrico y preeclampsia	72
Figura 5-2. Histograma de niveles de ácido úrico en toda la población	73
Figura 5-3. Niveles de ácido úrico entre casos y controles	75
Figura 5-4. Niveles de ácido úrico por momento de inicio de la preeclampsia.....	75
Figura 5-5. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia.....	76
Figura 5-6. Asociación entre niveles de ácido úrico y el inicio de preeclampsia	79
Figura 5-7. Manhattan y Q-Q plott del estudio ampliado del genoma en las gestantes del estudio GenPE sin ajustar	81
Figura 5-8 Manhattan y QQ plott del estudio ampliado del genoma en las gestantes del estudio GenPE ajustado por componentes principales	82
Figura 5-9. Asociación entre los SNP's individuales y los niveles de ácido úrico.....	90
Figura 5-10. Asociación entre los SNP's individuales y edad.....	91
Figura 5-11. Asociación entre los SNP's individuales y tabaquismo	91
Figura 5-12. Asociación entre el score genético sin ponderar y los niveles de ácido úrico	92
Figura 5-13. Asociación entre el score genético ponderado con pesos externos y los niveles de ácido úrico	93
Figura 5-14. Asociación entre el score genético ponderado con pesos internos y los niveles de ácido úrico	93
Figura 5-15. Asociación entre el score y la edad.....	94
Figura 5-16. Asociación entre el score y consumo de cigarrillo.....	95
Figura 5-17. Asociación entre el score y preeclampsia	96
Figura 5-18. OR e intervalos de confianza para preeclampsia obtenidos en los diferentes análisis observacionales y de variables instrumentales	97

Figura 6-1. Diagrama causal acíclico.	106
Figura 6-2. Relación funcional entre la presencia de preeclampsia y los niveles de ácido úrico.	104

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Glosario.....	15
Tabla 2. Abreviaturas.....	16
Tabla 3. Estudios de cohorte que evalúan la asociación entre ácido úrico y el riesgo de preeclampsia.....	22
Tabla 4. Ensayos clínicos controlados, aleatorizados, doble-ciego que evalúan la disminución de los niveles de ácido úrico con pacientes con preeclampsia	23
Tabla 5. Revisiones sistemáticas sobre ácido úrico y preeclampsia	23
Tabla 6. Estudios de cohortes que evalúan la asociación entre los niveles de ácido úrico antes de las 20 semanas de gestación y el riesgo de preeclampsia.....	25
Tabla 7. GWAS sobre ácido úrico.....	43
Tabla 8. Métodos estadísticos en Randomización Mendeliana.....	50
Tabla 9. Universidades y Hospitales en Estudio GenPE	56
Tabla 10. Definición operativa de las variables	64
Tabla 11. Características socio demográficas y clínicas de las participantes	74
Tabla 12. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia..	77
Tabla 13. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y momento de inicio de la preeclampsia.....	77
Tabla 14. Asociación entre el ácido úrico y la presencia de preeclampsia en un modelo de regresión logística acumulativo.....	78
Tabla 15. SNP's genotipificados en el GWAS de GenPE.....	80
Tabla 16. Genes y SNP's asociados a niveles de ácido úrico	82
Tabla 17. SNP's y proxies identificados en plataforma Affymetrix 6.0.....	85
Tabla 18. SNP's y proxies preseleccionados.....	86
Tabla 19. Score genético final	88
Tabla 20. Distribución de genotipos por etnicidad	88
Tabla 21. Estimadores del análisis de Randomización Mendeliana	97
Tabla 22. Evaluación de la Interacción	108
Tabla 23. Construcción del modelo de regresión logística	108
Tabla 24. Estimados de la regresión logística robusta con y sin valores extremos.....	105
Tabla 25. SNP's de ácido úrico en población caucásica.	110
Tabla 26. SNP's de ácido úrico en población de diferente origen étnico.....	111
Tabla 27. SNP's con significancia estadística identificados por UCLEB.	111

Lista de Símbolos y abreviaturas

Tabla 1. Glosario

Término	Definición
Alelo	Una de las presentaciones de un gen ubicado en un locus determinado
Dominante	Es el modelo de herencia que requiere la presencia de un solo alelo para que se presente una característica determinada.
Epidemiología genética	Estudio del papel que tienen los factores genéticos en la salud y enfermedad de las poblaciones
Equilibrio de Hardy Weinberg	Modelo matemático que predice las frecuencias genotípicas de la descendencia a partir de las frecuencias paternas de acuerdo a ciertas asunciones.
Estratificación de la población	Diferencia sistemática en las frecuencias alélicas de diferentes subpoblaciones pertenecientes a una población mayor. Altera la validez de las conclusiones si no se controla.
Estudios de asociación genética	Estudios observacionales (usualmente casos y controles) que estudian la asociación entre una variante genética (factor de riesgo) y su asociación con el desarrollo de una enfermedad.
Estudios ampliados del genoma	Estudios libres de hipótesis que utilizan tecnologías de chip para la medición millones de SNPs comunes y su asociación con un desenlace.
Fenotipo	Son los rasgos observables producidos por diferentes alelos para una característica determinada
Frecuencia alélica	Es la proporción de un alelo con respecto a todos los alelos en un locus de una población.
Frecuencia de alelo menor	Es la frecuencia del alelo menos frecuente de un gen o variante genética. Se tiene en cuenta para establecer criterios de inclusión de las variantes a estudiar.
Gen	Unidades de información genética
Genotipo	Es la dotación de alelos que tiene un organismo para una característica determinada
Locus	Lugar del cromosoma donde se sitúa un gen. (Plural: Loci)
Haplotipo	Conjunto de alelos localizados en un locus o un

Heterocigoto	conjunto de loci en un cromosoma. Individuo con un genotipo constituido por dos alelos diferentes
Homocigoto	Individuo con un genotipo constituido por dos alelos idénticos
Polimorfismo de Nucleótido Simple	Variante genética que se presenta cuando hay un cambio en una sola base del ADN (SNP por sus siglas en inglés). Son un tipo común de variante genética presente en gran porcentaje entre las poblaciones.
Randomización Mendeliana	Método de análisis que utiliza marcadores genéticos como variables instrumentales para realizar estimaciones causales de exposiciones modificables sobre el riesgo de enfermedad en estudios observacionales
Recesivo	Es el modelo de herencia que requiere la presencia de dos alelos iguales para que se presenta una característica determinada.
Variable instrumental	Variable que se asocia con la exposición de interés pero no con otros factores considerados como confusores.
Variante genética	Sección del código genético que varía entre los individuos

Tabla 2. Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>GenPE</i>	Estudio colombiano de casos y controles sobre Genética y Preeclampsia.
<i>GWAS</i>	Genome Wide Association Study (Estudios Ampliados del Genoma)
<i>SNP</i>	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleótido Simple)
<i>VI</i>	Variable Instrumental

Introducción

La Preeclampsia es una enfermedad exclusiva de la gestación humana que tiene un impacto negativo en la salud materna y fetal. (1) En Latinoamérica y el Caribe, es la principal causa de muerte materna (2) y en Colombia, si bien la mortalidad materna secundaria a trastornos hipertensivos del embarazo ha disminuido en los últimos años, esta entidad sigue ocupando el primer lugar de todas las causas de muerte en esta población, (22,4%) (3) alejando al país de lo propuesto en los objetivos de desarrollo del milenio respecto a la salud materna. (4)

Durante los últimos años, se han realizado avances importantes en el entendimiento de la etiología y fisiopatología de la preeclampsia. No obstante, este conocimiento no ha sido traducido a estrategias terapéuticas para esta enfermedad, a excepción del consumo de ácido acetil salicílico en grupos de mujeres con alto riesgo (5) y la administración de sulfato de magnesio para la prevención de la eclampsia. (6) En el estudio etiológico de esta enfermedad, múltiples metabolitos en sangre han sido evaluados y planteados como posibles factores causales, entre ellos el ácido úrico, un marcador de estrés oxidativo que ha mostrado plausibilidad biológica a partir de estudios in vitro y cohortes con seguimiento desde el inicio de la gestación. Sin embargo, los datos provenientes de estudios observacionales han reportado resultados contradictorios para este marcador, posiblemente por pequeños tamaños de muestras, causalidad reversa y/o confusión residual. (7, 8)

Por otra parte, estudios con mayor nivel de evidencia como ensayos clínicos aleatorizados disponibles a la fecha y que estudian la relación del ácido úrico en mujeres con preeclampsia, no evalúan adecuadamente el posible efecto causal de este marcador sino su papel en el desarrollo de complicaciones posterior al diagnóstico de preeclampsia. (9, 10) Por tanto, un escenario en el que se puedan superar los obstáculos que han presentado los estudios observacionales en su diseño o análisis sería ideal con el objetivo de aportar información metodológicamente más fuerte que permita dilucidar el posible efecto causal de este marcador en la preeclampsia y eventualmente una intervención terapéutica puntual.

Un enfoque que permitiría comprender mejor la relación causal entre una exposición modificable y un desenlace de interés es planteado por la epidemiología genética. Si bien esta rama de la epidemiología se ha enfocado en el estudio de la heredabilidad de las enfermedades o la susceptibilidad individual para desarrollar una patología, también contribuye al estudio de los determinantes ambientales de las enfermedades a nivel poblacional. Recientemente y con la disponibilidad de estudios ampliados del genoma en grandes poblaciones, se han realizado progresos importantes en el conocimiento del papel que desempeñan los genes y sus polimorfismos en las enfermedades complejas (como la Preeclampsia). En este contexto y bajo la premisa de la segunda ley de Mendel (asignación aleatoria de los alelos en la meiosis), se ha planteado el uso de las variantes genéticas como variables instrumentales (no asociadas a variables de confusión) para estudiar relaciones causales entre un factor de riesgo modificable y una enfermedad, utilizando datos de estudios observacionales. Dicho análisis es conocido como Randomización Mendeliana, el cual ha sido aplicado a diferentes exposiciones modificables como niveles elevados de Proteína C Reactiva y enfermedad coronaria, entre otros siendo capaz de reportar estimadores causales de asociación al superar las limitaciones de los estudios observacionales tradicionales. (11, 12)

En Colombia, desde el año 2000 el “Proyecto GenPE” se ha desarrollado en diferentes ciudades del país. Este proyecto es un estudio de casos y controles en gestantes con y

sin preeclampsia que tiene como objetivo la evaluación de genes candidatos asociados a esta enfermedad así como el efecto de marcadores séricos y plasmáticos en el desarrollo de la misma. (13) Actualmente, el estudio cuenta con información sobre niveles sérico de ácido úrico medidos al momento del parto así como de variantes genéticas identificadas a partir de estudios ampliados del genoma. Este contexto representa una oportunidad para implementar técnicas innovadoras de análisis como la Randomización Mendeliana para comprender mejor el posible efecto causal del ácido úrico en el riesgo de preeclampsia y así aportar información confiable y que supere las limitaciones presentadas en los análisis observacionales tradicionales.

1. Planteamiento del problema

Los niveles elevados de ácido úrico son un hallazgo frecuente en las mujeres con Preeclampsia y dicha manifestación ha sido reportada en múltiples estudios observacionales desde hace varias décadas. (14-16) Sin embargo, la evidencia disponible no permite establecerse si el ácido úrico contribuye al desarrollo de la enfermedad o si es una consecuencia de la misma.

Tradicionalmente, se ha planteado que los niveles elevados de ácido úrico encontrados en las pacientes con esta patología corresponden a una disminución de la filtración glomerular, aumento de la reabsorción y reducción de la secreción en el túbulo proximal, secundarios a la afectación renal la cual es evidente al final de la gestación. No obstante, la evaluación de niveles ácido úrico a través de algunos estudios experimentales y cohortes prospectivas de gestantes desde el comienzo de la gestación han sugerido cambios fisiopatológicos a nivel vascular y placentario en presencia de este marcador, que pueden contribuir al desarrollo de la Preeclampsia como tal. Por ejemplo, en el trofoblasto humano obtenido durante el primer trimestre de embarazos normales, se ha reportado un aumento en la secreción de sustancias como Interleuquina 1 β pro-inflamatoria, así como en la expresión de Caspasa cuando las células son expuestas a ácido úrico. (17) De esta misma forma, se ha reportado una atenuación dosis dependiente de la invasión del trofoblasto y disminución de la capacidad para desplazar las células endoteliales en la decidua uterina, cuando el trofoblasto es expuesto a éste marcador. (18) Así mismo, en las células vasculares del músculo liso, los niveles elevados de ácido úrico se han asociado con el aumento de la expresión de ARNm y la secreción de marcadores pro-inflamatorios como la proteína C - reactiva. (19) Adicionalmente, en células endoteliales humanas aisladas de la vena umbilical, el ácido úrico ha mostrado reducir la producción de óxido nítrico, debido a la disminución de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial, lo cual conduce a disfunción endotelial, (20) un hallazgo frecuente en pacientes con Preeclampsia. (21)

Teniendo en cuenta la evidencia anterior, mecanismos biológicos diferentes a la afectación renal presente en el tercer trimestre sugieren un posible efecto biológico del

ácido úrico con un impacto negativo sobre el tejido placentario y la vasculatura sistémica desde el inicio de la gestación, lo cual podría desencadenar las manifestaciones clínicas de hipertensión y proteinuria al final del embarazo. (22, 23) Estos hallazgos permiten suponer que niveles elevados de ácido úrico pueden tener un papel en la génesis de la enfermedad, sin embargo, la evidencia disponible a partir de estudios observacionales tiene resultados contradictorios.

Muchos de los estudios observacionales en torno a éste tema son diseños de casos y controles. La gran mayoría, han tenido como objetivo probar las diferencias de medias o medianas de los niveles de este marcador entre las pacientes con y sin Preeclampsia al final de la gestación. Llama la atención que los estudios reportados presentan tamaños de muestra pequeños que pueden no ser adecuados para demostrar una diferencia entre los grupos que se comparan e incluso, es frecuente encontrar análisis de asociación no ajustados por variables de confusión. Adicionalmente, este tipo de diseño no permite evaluar la una posible asociación causal en el desarrollo de la enfermedad pues puede presentarse causalidad reversa. (7, 14-16, 24-29) Por otra parte, la evaluación de la precisión diagnóstica a través de la estimación de las características operativas del ácido úrico ha sido otro enfoque bastante utilizado. No obstante, el marcador no ha mostrado un buen desempeño, pues en su mayoría los estudios encuentran sensibilidades bajas. (26, 29, 30) Teniendo esto en cuenta, otros diseños de estudios como cohortes o ensayos clínicos en torno a ésta temática son enfoques necesarios para evaluar de una mejor manera el posible efecto causal entre el ácido úrico y la Preeclampsia. En la Tabla 3, se exponen estudios de cohorte donde se realizan mediciones de ácido úrico en participantes con hipertensión gestacional y se evalúa la progresión a preeclampsia al final de la gestación. En los tres estudios, se evidencian estimadores de asociación que reflejan un riesgo de presentar la enfermedad por el incremento en una unidad del ácido úrico. Dichos estimadores también muestran que la asociación estudiada está afectada por confusión, pues se modifican al realizar el análisis de manera ajustada. Sin embargo, no todos los posibles confusores, por ejemplo la dieta y datos sobre obesidad o sobrepeso de la gestante al momento de la toma del ácido úrico son tenidos en cuenta en los análisis ajustados. Esta situación refleja la posibilidad de persistir confusión residual en la relación causal de interés.

Tabla 3. Estudios de cohorte que evalúan la asociación entre ácido úrico y el riesgo de preeclampsia

Autor (año)	Criterio de inclusión	Edad materna	Enfoque	Muestra (PE)	OR (IC 95%)	Confusores
Hawkins (2012), Australia (31)	Gestantes con hipertensión gestacional	n.r.	Retrospectivo	1880 (1142)	OR 2.3 (1.7-3.0) ORa 2.2 (1.7-3.0)	Paridad
Bellomo (2011), Italia (32)	Gestantes con hipertensión de novo	30.4 (4.1)	Prospectivo	163 (73)	OR 9.1 (4.8-17.4) ORa 7.1 (3.2-15.7)	Edad, edad gestacional, hemoglobina, plaquetas, creatinina, presión sistólica, diastólica
Wu (2012), China (33)	Gestantes con hipertensión gestacional	30.3 (5.8)	Retrospectivo	249 (158)	OR 3.8 (1.51-3.83) ORa 2.33 (1.45-3.74)	Edad, edad gestacional, ácido úrico al inicio de la hipertensión, tratamiento antihipertensivo, paridad, tabaquismo, obesidad, historia de preeclampsia

Edad materna reportada como el promedio de años y su desviación estándar.

El otro diseño disponible para evaluar causalidad está representado por los ensayos clínicos. En este tipo de estudios, un escenario hipotético para evaluar el efecto causal del marcador sería a través de la asignación aleatoria de una intervención que disminuya los niveles de ácido úrico en gestantes previamente sanas para evaluar el riesgo de desarrollar la enfermedad al final de la gestación. Sin embargo, en el caso del ácido úrico y la preeclampsia sólo hay disponibles dos publicaciones donde se hacen intervenciones para disminuir los niveles de este marcador pero en pacientes con diagnóstico confirmado de preeclampsia, y su objetivo es evaluar las complicaciones de la enfermedad como desenlace principal, (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayos clínicos controlados, aleatorizados, doble-ciego que evalúan la disminución de los niveles de ácido úrico con pacientes con preeclampsia

Autor (año), país	Criterio de inclusión	Edad Exp/No exp	Fármaco	Exp/No exp	Desenlaces	Estimadores
Schackis (2004), Suráfrica (10)	n.r.	26/26	Probenecid 250mg/12hrs	20/20	Eclampsia, Abruption, edema pulmonar y muerte fetal.	Niveles de ácido úrico Probenecid: 28.5 (18–32), placebo: 19 41.0 (31–73) p= < 0.01.
Gulmezo glu (1997), Suráfrica (9)	PA: 160/110 mmHg PU: 2+ tira reactiva	29/28	Alopurinol 100mg/12hrs	27/29	Prolongación del embarazo, complicacion es maternas	Niveles de ácido úrico Alopurinol: 0.32 (0.19-0.81), placebo: 0.43 (0.28-0.55) p= 0.004.

Edad materna reportada como el promedio de años. n.r. No reporta. Niveles de ácido úrico en (mmol/L)

Por otra parte, las revisiones sistemáticas disponibles sobre ácido úrico y preeclampsia se han centrado en evaluar las características operativas del marcador para diagnóstico de la enfermedad y/o sus complicaciones. Algunas de las revisiones se abstienen de presentar datos agrupados dada las diferencias clínicas y metodológicas entre los estudios, dificultando la interpretación de los resultados. Para aquellos con un estimador agrupado, se observan LR que producen cambios pequeños entre la probabilidad pre y post test. Meads et al, presentan sus resultados agrupados sin embargo el ácido úrico presente una sensibilidad baja para el diagnóstico de la enfermedad (Tabla 5).

Tabla 5. Revisiones sistemáticas sobre ácido úrico y preeclampsia

Autor (Año)	Artículos	n	Desenlace	Estimadores	Comentarios
Meads (2008) (34)	5	514	Preeclampsia	S: 36% (IC95% 22 - 53%). E: 83% (IC95% 73 - 90%).	La prueba no es precisa.
Cnossen* (2006) (35)	5	572	Preeclampsia	S: 0.0% - 55.6% (IC95% n.r.) y E: 76.9% - 94.9% (IC95% n.r.).	La evidencia no permite generar conclusiones firmes sobre la utilidad del

					marcador.
Thangaratinam (2006) (36)	18	3193	Predicción de complicaciones maternas y fetales en mujeres con preeclampsia	Eclampsia LR + 2.1 (IC95% 1.4–3.5) y LR - 0.38 (IC95% 0.18–0.81). Hipertensión severa LR+ 1.7 (IC95% 1.3–2.2) y LR - 0.49 (IC95% 0.38–0.64)	El ácido úrico es un pobre predictor de complicaciones maternas y fetales en mujeres con preeclampsia
Koopmans* (2009) (37)	8	1565	Precisión diagnóstica para complicaciones de la preeclampsia	Eclampsia: S: 36% - 92%. E: 54% - 95%. (IC95% n.r.) HELLP: S: 16% - 24%. E: 46% - 91%. (IC95% n.r.)	El ácido úrico parece un test útil en el manejo de la preeclampsia.

S: Sensibilidad, E: Especificidad. *Datos sin agrupar por alta heterogeneidad clínica y metodológica. LR: Likelihood Ratio

Debido a la disponibilidad de éste tipo de información, en las Guías de Práctica Clínica publicadas en 2012 y 2013 acerca de la atención sobre las complicaciones hipertensivas asociadas con el embarazo para Colombia, la medición de ácido úrico sólo se considera en las pacientes con un riesgo biopsicosocial elevado, y se da una recomendación C con un nivel de evidencia IV, lo que significa que la información disponible hace parte de series de casos, estudio de cohortes y casos y controles de mala calidad. (38, 39)

A pesar de las limitaciones de la evidencia actual, es importante resaltar el tipo de información disponible que aportaría argumentos sobre el posible efecto causal del ácido úrico. Los estudios de cohortes que realizan mediciones del marcador antes de la semana 20 de gestación (momento a partir del cual se puede hacer el diagnóstico de preeclampsia), cobran vital importancia y se exponen en la Tabla 6. En estos estudios,

los niveles elevados del marcador se presentaron antes del inicio de la enfermedad (temporalidad entre la exposición y desenlace) y reportan estimadores ajustados de riesgo al comparar el último cuartil de distribución del metabolito con el de referencia. Teniendo en cuenta los hallazgos de éstas cohortes y los provenientes de estudios in vitro, puede suponerse una plausibilidad biológica del ácido úrico sobre el desarrollo de la preeclampsia, la cual debe demostrarse adecuadamente.

Tabla 6. Estudios de cohortes que evalúan la asociación entre los niveles de ácido úrico antes de las 20 semanas de gestación y el riesgo de preeclampsia

Autor (año)	País (raza)	Caso	Edad materna con PE / sin PE	Tipo; con PE/ sin PE	Medición ; unidades	Estimador (IC 95%)	Ajuste
Zhou (2012) (40)	China (asiáticas)	PA > 140/90 PU >300mg	29.6/28.6	P. 61/939	Ensayo colorimétrico; umol/L	ORa 2.06 (0.91-4.70)	Edad materna IMC al inicio
Wolak (2012) (41)	Israel (medio oriente)	n.r.	n.r.	R. 264/5243	n.r.; mEq/L	ORa 1.40 (1.20-1.70)	n.r.
Laughon (2011) (42)	Estados Unidos (caucásicas y afroamericanas)	PA > 140/90 & PU >300mg	n.r.	P. 60/1370	Ensayo colorimétrico; mg/dl	ORa 1.82 (1.03-3.21)	Paridad e IMC al inicio

Edad materna en años. Tipo: Direccionalidad (P: Prospectivo, R: Retrospectivo). PE: Preeclampsia, n.r.: no reportado, PA: Presión arterial, PU: proteinuria. IMC: Índice de Masa Corporal

Teniendo en cuenta la evidencia anterior, a través de los estudios observacionales se ha encontrado una asociación de riesgo entre el ácido úrico y la preeclampsia, la cual se atenúa posterior al análisis ajustado por posibles variables de confusión. Sin embargo, la posibilidad de causalidad reversa (para estudios de casos y controles) y especialmente de confusión residual no permiten establecer el efecto real de este marcador en el desarrollo de esta patología.

Dichas limitaciones pueden superarse a través del enfoque brindado por la epidemiología genética. En primer lugar, en el contexto de variaciones genéticas que puedan producir alteraciones fenotípicas que semejen los efectos biológicos de una exposición ambiental modificable, puede también entonces alterarse el riesgo de desarrollar una enfermedad. En segundo lugar, se debe hacer énfasis en que la distribución de los polimorfismos es independiente de las variables de confusión que afectan el estudio de una relación causal dado la asignación aleatoria de los alelos al momento de la concepción. Es aquí donde el análisis de Randomización Mendeliana juega un papel importante, pues los marcadores genéticos como los Polimorfismos de Nucleótido Simple (*SNP* por sus siglas en inglés) son utilizados como *variables instrumentales* por tener una asociación con la exposición de interés (niveles de ácido úrico), no estar relacionados directamente con el desenlace (preeclampsia) y ser independientes de otros posibles confusores en el estudio de la asociación de interés (edad materna y tabaquismo). Al disponer de información de marcadores séricos y variantes genéticas en gestantes colombianas pertenecientes al Proyecto GenPE, se hace posible la implementación del análisis de Randomización Mendeliana para establecer el potencial efecto causal del ácido úrico en el desarrollo de la preeclampsia.

1.1 Pregunta de investigación

¿Están los niveles de ácido úrico asociados causalmente con la presencia de Preeclampsia en mujeres primigestantes colombianas, menores de 26 años, previamente sanas y captadas al momento del parto, entre 2001 y 2012 en 8 ciudades del país?

P: Mujeres primigestantes, menores de 26 años, previamente sanas.

I: Gestantes con marcadores genéticos que eleven los niveles de ácido úrico

C: Gestantes con marcadores genéticos que no eleven los niveles de ácido úrico

O: Preeclampsia

Factible: La recolección de la información básica así como de las mediciones y resultados de los polimorfismos en las pacientes a incluir en el estudio ya se encuentra realizado, por tanto se cuenta con el material para el análisis estadístico correspondiente.

Interesante: Aborda una problemática común en nuestro país, con gran impacto en salud pública y en la que es necesario seguir trabajando para encontrar formas de diagnóstico temprano con el fin de disminuir las muertes maternas por esta causa.

Novedosa: No se han realizado hasta el momento análisis de Randomización mendeliana evaluando el papel causal del ácido úrico en mujeres con Preeclampsia.

Ética: No se realizarán intervenciones de ningún tipo en las pacientes, pues solo se trabajarán con los datos recolectados de quienes dieron su aprobación para el uso de su información en diferentes proyectos derivados del proyecto GenPE al momento de la firma del consentimiento informado.

Relevante: Pretende responder y aclarar el impacto de los factores de riesgo causales con la PE, con el fin de poder identificar tempranamente la enfermedad.

1.2 Justificación

En la investigación epidemiológica, el efecto causal de un fenotipo modificable es de interés pues a través de una intervención específica y estrategias preventivas podría disminuirse la frecuencia de una enfermedad, así como sus posibles complicaciones. Sin embargo, el estudio de las causas en las enfermedades complejas a través de los métodos de la epidemiología observacional, presenta problemas relacionados con confusión residual y causalidad reversa que no permiten establecer conclusiones fuertes sobre una asociación de interés, como en el caso del ácido úrico y la preeclampsia. Si bien los estudio in vitro publicados recientemente reconocen un efecto biológicamente plausible en ésta enfermedad, este marcador tiene evidencia contradictoria e incluso débil metodológicamente para definir el posible efecto causal en la preeclampsia.

Así mismo, teniendo en cuenta que la preeclampsia es una enfermedad con un impacto negativo sobre la madre y el producto, los esfuerzos por estudiar adecuadamente los

factores etiológicos son necesarios. Por tanto, nuevas estrategias que no estén afectadas por las limitaciones mencionadas previamente y que además, puedan establecer causalidad (especialmente si no se disponen de ensayos clínicos en la temática) podrían brindar información relevante para tomar decisiones terapéuticas o preventivas.

La unión de la información genética y los datos observacionales puede ayudar a comprender de una mejor manera, la relación entre un fenotipo intermedio y un desenlace. Teniendo esto en cuenta, variantes genéticas estrechamente relacionadas con un factor de riesgo modificable, como los niveles elevados de ácido úrico pueden ser candidatas a variables instrumentales para evaluar el efecto causal sobre un desenlace. Este enfoque conocido como Randomización Mendeliana, puede ayudar a establecer de forma no sesgada el verdadero papel del ácido úrico en la preeclampsia. De comprobarse, aportaría información que sirva de argumento fuerte para la evaluación de una intervención terapéutica que disminuya los niveles de este marcador.

Por tanto, a partir de los datos del Estudio GenPE, en el que se cuenta con información de marcadores genéticos obtenidos a partir de estudios ampliados del genoma y niveles séricos de ácido úrico en gestantes colombianas con y sin preeclampsia, se hace posible estudiar la hipótesis de causalidad entre éste marcador y la enfermedad, mediante una técnica de análisis innovadora que utiliza variables instrumentales, libres de confusión y que no ha sido aplicada hasta el momento para la pregunta de investigación en cuestión.

2. Marco de referencia

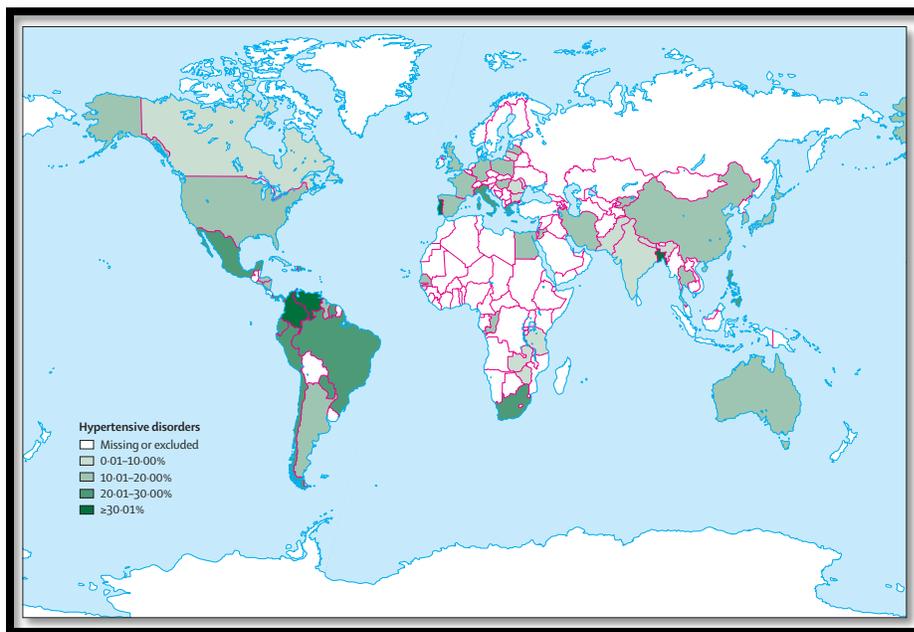
La Preeclampsia se caracteriza por la presencia de hipertensión arterial (Presión arterial sistólica >140 y/o diastólica >90 mmHg) y proteinuria (300mg/24hr o 1+ por tirametría en muestra aislada de orina), después de la semana 20 de gestación, según criterios propuestos por el National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. (43)

El único tratamiento definitivo para ésta enfermedad es el parto, pues así se garantiza la eliminación del tejido placentario en su totalidad sin embargo, esta opción no siempre es la mejor alternativa pues en embarazos lejos del término, el producto puede tener más probabilidades de complicaciones respiratorias entre otras, al nacimiento. (1)

2.1 Carga de la enfermedad

La Preeclampsia complica entre el 2 y 8% de todos los embarazos y es la segunda causa de muerte materna a nivel mundial; sin embargo estos datos pueden variar entre las regiones. (1) Para 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que los trastornos hipertensivos del embarazo eran responsables del 16,1% (IC95% 6,7% - 24,3%) de las muertes maternas en los países desarrollados. (44) No obstante, esta cifra es más alta para los países de Latinoamérica y el Caribe (25,7%, IC95% 7,9% – 52,4%) y muy baja para las regiones africanas y asiáticas, Figura 2-1. (2)

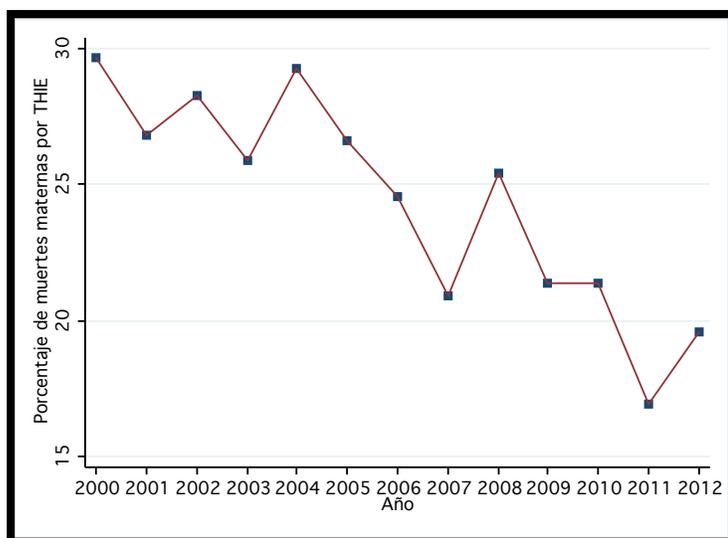
Figura 2-1. Proporción de muertes maternas por Trastornos Hipertensivos del embarazo a nivel mundial.



Tomado de: WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. (2)

En Colombia, es difícil establecer la incidencia real de esta enfermedad pues no se cuenta con estudios de cohortes que reporten indicadores confiables. (45) Sin embargo, las muertes maternas y sus causas son eventos de notificación obligatoria en todo el país, lo cual ha permitido tener información relacionada con el comportamiento de las causas de la mortalidad materna. Según el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Sistema de Vigilancia Epidemiológico (SIVIGILA) en el período de 2010 a 2012, los trastornos hipertensivos ocuparon el primer lugar, siendo responsables del 22,4% de todas las muertes maternas en el país; (3) y aunque la mortalidad materna secundaria a los trastornos hipertensivos ha disminuido durante ese periodo (Figura 2-2), éstos siguen ubicándose dentro de las principales causas de muertes maternas y por tanto, contribuyendo de manera negativa con la Razón de Mortalidad Materna. Esta es una de las razones por las cuales Colombia no ha podido acercarse a la meta propuesta en los objetivos de desarrollo del milenio en cuanto al tópico relacionado con mejorar la salud materna. (4)

Figura 2-2. Porcentaje de muertes maternas secundarias a Trastornos Hipertensivos del Embarazo en Colombia entre 2000 y 2012



Fuente: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Año 2012 con datos parciales. (46)

Por otra parte, los trastornos hipertensivos del embarazo desencadenan otras complicaciones que afectan negativamente tanto a la madre como al feto. Por ejemplo, el síndrome HELLP (H "hemólisis", EL "elevated liver enzymes", LP de "low platelet count") se ha descrito como complicación que aparece entre el 10% y 20% de los casos de Preeclampsia severa, principalmente en embarazos pretérmino (50%). Por su parte, la eclampsia (convulsiones tónico-clónicas en una mujer embarazada o recientemente desembarazada que no se pueden atribuir a otras causas), puede aparecer en el 1-2% de la preeclampsia severa y aunque es difícil de predecir, los signos y síntomas premonitorios pueden estar presentes en el 79% de los casos durante la semana antes de su aparición. (1) Adicionalmente, efectos a largo plazo de la Preeclampsia en la madre y el producto también se han reportado. Diferentes estudios han encontrado una asociación entre el antecedente de Preeclampsia y la presencia de enfermedades cardiovasculares (OR 2,28; IC95% 1,87 - 2,78), enfermedad cerebrovascular (OR = 1.76, IC95% 1,43 - 2,21) e hipertensión arterial (RR = 3,13; IC95% 2,51 - 3,89) en la madre a futuro. (47) En el producto de la gestación, los efectos de la preeclampsia pueden presentarse in útero, al momento del nacimiento y durante el desarrollo. La disminución de la circulación útero-placentaria, secundaria a la inadecuada invasión del trofoblasto y

disfunción endotelial generada por la Preeclampsia, puede conducir a la restricción del crecimiento intrauterino con hipoxia y acidosis subyacente. Su frecuencia varía entre las poblaciones y se han reportado incidencias entre el 9-35% según la edad gestacional en la que se realicen los estudios. Así mismo, debido al riesgo de abrupcio de placenta y la restricción de crecimiento, el producto tiene mayor probabilidad de desarrollar sufrimiento fetal agudo durante el trabajo de parto y morir in útero, especialmente en los casos de Preeclampsia severa. Sin embargo, la mortalidad perinatal puede variar según la región. Por ejemplo, en el Reino Unido el 6% de los fetos de madres con eclampsia mueren versus el 27% de los fetos en países de medianos y bajos ingresos. (48) En los embarazos lejos del término, pueden presentarse complicaciones relacionadas con la prematuridad como enterocolitis, retinopatía, displasia broncopulmonar y alteraciones en el neurodesarrollo en el periodo postnatal. A largo plazo, se ha descrito que los hijos de madres con Preeclampsia tienen más probabilidades de ser hospitalizados en su vida adulta (11-25%) y de desarrollar trastornos hematológicos, endocrinos, metabólicos entre otros. (49) La afectación del binomio madre-hijo por la Preeclampsia es un escenario que da lugar a una continua búsqueda de evidencia, la cual pueda traducirse en medidas preventivas y/o terapéuticas con el fin de evitar las consecuencias negativas de ésta enfermedad.

2.2 Fisiopatología de la preeclampsia

La Preeclampsia es una enfermedad compleja, pues en su desarrollo hay una interacción de factores genéticos y medioambientales que propician la aparición del cuadro clínico. Teniendo esto en cuenta, la causa específica de la Preeclampsia permanece aún desconocida y esto ha generado múltiples teorías sobre su etiología. (1) De manera general se ha identificado un componente materno y otro placentario en el desarrollo de la enfermedad.

2.2.1 Componente materno

Diferentes características maternas previas al embarazo han sido identificadas al aumentar la probabilidad de presentar Preeclampsia durante la gestación entre ellas, hipertensión arterial crónica (RR 7.7 IC95% 5.7-10.1) (50), obesidad (ORa 4.19 IC95% 3.21–5.48) (51) y niveles elevados de triglicéridos (Diferencia promedio ponderada 0.24 mmol/l, IC95% 0.13–0.34, P <0.0001) (52). Dichas características son conocidos factores de riesgo cardiovasculares y pueden reflejar un camino fisiopatológico común entre la Preeclampsia y las enfermedades cardiovasculares. Estos factores se han asociado con un aumento de marcadores inflamatorios y radicales libres que propician el exceso de estrés oxidativo desde el inicio del embarazo. (53) Adicionalmente, se ha reportado que aquellas mujeres con familiares de primer grado (madre o hermanas), tienen hasta 5 veces más riesgo de presentar la enfermedad. En esta misma vía, los genes paternos se han relacionado con un aumento en el riesgo de Preeclampsia, en las mujeres que tienen embarazos de hombres que han tenido embarazos con Preeclampsia previamente. (54) Sin embargo, los estudios de genes candidatos en esta enfermedad publicados a la fecha, no han reportado asociaciones robustas con evidencia epidemiológica fuerte. Replicaciones de los resultados con poblaciones más grandes son necesarios para tener un mejor conocimiento de la base genética de esta entidad. (55)

2.2.2 Componente placentario

La placenta es un factor predisponente para el desarrollo de la Preeclampsia. Embarazos molares (con presencia de placenta pero no de feto) y la presencia de restos placentarios después del parto, se han asociado con el desarrollo del síndrome clínico de hipertensión y proteinuria así como, la resolución del mismo 48 horas después del parto cuando la eliminación del tejido placentario se ha producido. (56)

Desde el primer trimestre, el desarrollo de una placentación anormal se ha asociado a remodelación superficial o ausente de las arterias espirales uterinas por parte del trofoblasto extraveloso, (57) ocasionando una alteración del flujo placentario con eventos

de isquemia/reperfusión (58) (59) y liberación de sustancias pro inflamatorias y anti angiogénicas al sistema circulatorio materno. (59) La disminución del flujo útero-placentario y los eventos de isquemia/reperfusión secundarios a la inadecuada invasión del trofoblasto, podrían ser responsables del aumento de la hipoxia en el espacio intervelloso, lo cual a su vez podría aumentar la producción de sustancias pro oxidantes (super óxido y radicales libres) y disminuir la secreción de óxido nítrico, resultando en un exceso de estrés oxidativo en el espacio placentario de las pacientes con preeclampsia. Además, se ha encontrado tanto en placentas como en el sistema circulatorio materno de pacientes con preeclampsia, mayor producción de cantidades de superóxido y mucho menos de sustancias antioxidantes en comparación con las placentas y pacientes con gestaciones normales. (60)

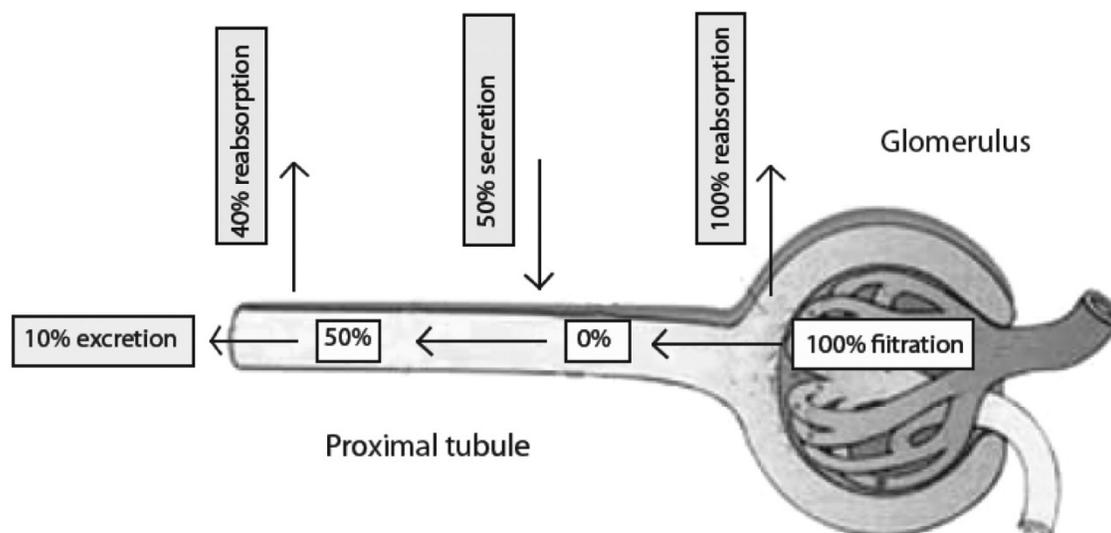
El resultado final de los procesos fisiopatológicos que tienen lugar en el desarrollo de la preeclampsia, se traducen en disfunción del endotelio materno. En la preeclampsia, la presencia de hipertensión arterial de novo y proteinuria evidencian al endotelio como órgano diana de la enfermedad. Los signos y síntomas (vasoconstricción arterial sistémica y endoteliosis glomerular en el riñón), muestran que la vasculatura especialmente en los sitios con endotelio fenestrado, es la más afectada. La activación del endotelio en las pacientes con preeclampsia se ha asociado con niveles elevados en sangre de sustancias vasoconstrictoras, marcadores de estrés oxidativo, y citoquinas inflamatorias, así como disminución en la producción de prostaciclina y óxido nítrico, importantes vasodilatadores, en circulación materna. (60) Dentro de los marcadores de estrés oxidativo, el ácido úrico se ha comportado como un metabolito asociado a la presencia de la preeclampsia desde hace más de un siglo, sin embargo no existe una recomendación fuerte sobre su uso en el diagnóstico de la enfermedad por baja calidad de la evidencia científica disponible.

2.3 Ácido Úrico

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas. Las bases purínicas (guanina e hipoxantina) son catalizadas por la enzima xantina oxidasa a xantina y ácido

úrico. En la mayoría de los mamíferos, los niveles permanecen bajos (0.5-1.0 mg/dl) al ser convertido en alantoína (un producto de excreción muy soluble) por la enzima Urato oxidasa (Uricasa). En los humanos y grandes primates, sus valores se encuentran más elevados debido a múltiples mutaciones que inactivaron el gen que codifica para la enzima durante la evolución de los homínidos. (61) La inactivación de la enzima Uricasa y la subsecuente elevación en los niveles de este marcador se han considerado una ventaja evolutiva, pues la función del ácido úrico es la de ser un potente antioxidante plasmático (contribuye en >50% de la capacidad antioxidante en la sangre), un poderoso eliminador de radicales libres y quelante de iones metálicos, cuando existe un medio hidrofílico. (62) Adicionalmente, el aumento en los niveles se ha considerado como una ventaja al permitir que los homínidos pudiesen mantener la presión sanguínea con baja ingesta de sal, suponiéndose que este aumento pudo ser esencial para mantener la posición vertical de esta especie. (61, 63) La homeostasis en sus niveles depende del equilibrio entre la producción (dieta rica en purinas, alcohol, fructosa) y la secreción/reabsorción en el túbulo renal (70%) e intestinal (30%). Cuando el ácido úrico llega al riñón es filtrado por el glomérulo en su totalidad, para luego ser reabsorbido en su mayoría (90%) al final del túbulo proximal. Figura 2-3 (64)

Figura 2-3. Excreción renal de ácido úrico



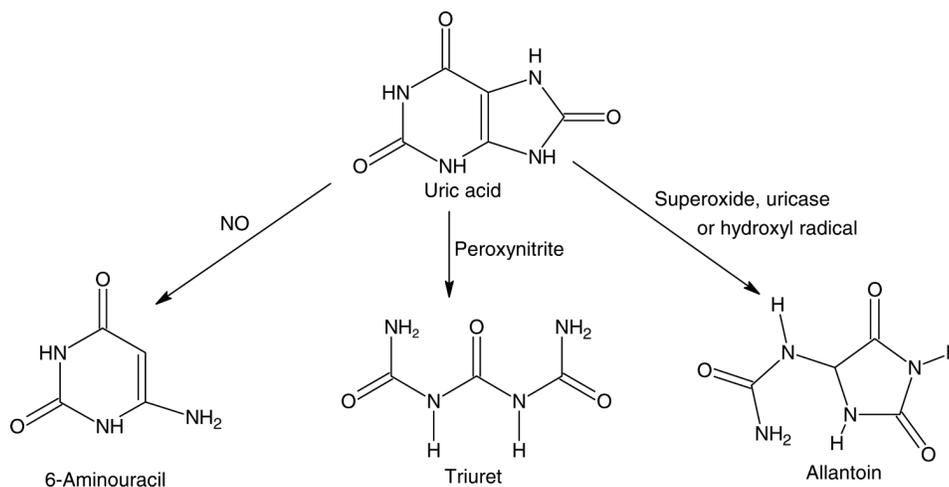
Tomado de: Bergamini et al. (65)

Diferentes Proteínas Transportadoras de ácido úrico (URAT) han sido identificadas en células tubulares apicales y basolaterales renales, como las responsables de la actividad reabsortiva a nivel tubular. Entre ellas, la proteína URAT1 (gen *SLC22A12*), OAT4 (gen *SLC22A11*) y GLUT9 (gen *SLC2A9*). (64) Los estudios ampliados del genoma han identificado varios dichos genes asociados a niveles elevados de ácido úrico y enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Por ejemplo, mutaciones en el gen *SLC22A12*, *SLC2A9* y *ABCG2* (un transportador renal y extra renal) se han asociado a niveles elevados de éste marcador y presencia de gota en la vida adulta. GLUT9 se ha identificado como responsable del 4% en la varianza de los niveles. (66, 67)

Si bien la actividad principal del ácido úrico es la de ser un antioxidante plasmático, existe una paradoja en su función pues se ha reportado que cuando los niveles de este metabolito permanecen elevados de manera crónica en presencia de un ambiente lipofílico, su función protectora se inhibe y se convierte en una sustancia pro oxidante (formando radicales libres). (63) Un desencadenante inicial del daño producido por este marcador se ha identificado a través de la vía del inflamosoma, donde los cristales monosódicos de urato han mostrado un efecto negativo en la línea de monocitos-macrófagos al estimular la secreción de interleuquinas inflamatorias (IL-1 β). Esta secreción recluta otras células inflamatorias y amplifica esta reacción. (68)

Estudios in vitro han evidenciado disminución de óxido nítrico en cultivos celulares, así como bloqueo de la vasodilatación inducida por acetil colina y disminución de los nitritos circulantes cuando se exponen a altos niveles de éste marcador. También, se ha demostrado que el ácido úrico reacciona directamente con el óxido nítrico a través de una reacción rápida e irreversible, que resulta en la formación de 6-aminouracilo y depleción de óxido nítrico comprometiendo su acción vasodilatadora en el endotelio. (62) Adicionalmente, estudios in vitro evidencian que el ácido úrico reacciona en la presencia de peroxinitrito, generando intermedios reactivos y productos alquilos (triureto), los cuales también pueden reaccionar con las células endoteliales alterando su función normal. (Figura 2-4) (69)

Figura 2-4. Productos derivados del ácido úrico en presencia de otros oxidantes



Tomado de: (69)

En esta misma vía, estudios en animales han reportado que al inhibir la enzima Uricasa, los niveles de ácido úrico se elevan de forma rápida y después de tres semanas, la presión arterial se incrementa y se producen daños irreversibles en la vasculatura y el glomérulo. Estos cambios son mediados por alteraciones en el eje renina-angiotensina a nivel juxtaglomerular y baja disponibilidad de óxido nítrico en la macula densa, resultando en vasoconstricción de la arteriola aferente y eferente. (70)

Por otra parte, diversos estudios observacionales prospectivos en humanos han mostrado que los niveles elevados de ácido úrico son un factor de riesgo independiente para desarrollar enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial (RR 3.0, IC95% 1.56-3.97 para hombres y RR 3.4, IC95% 2.10-3.81 para mujeres), (71) diabetes mellitus tipo 2 (RR 1.56, IC95% 1.39-1.76), (72) accidentes cerebrovasculares (RR 1.47, IC95% 1.19, 1.76) y muerte (RR 1.26, IC95% 1.12, 1.39). (73) Estos hallazgos han sido relevantes para comprender de una mejor manera como el ácido úrico puede contribuir causalmente a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares a través del estrés oxidativo y la disfunción endotelial.

2.3.1 Ácido úrico en el embarazo normal

En la etapa temprana de la gestación normal, las concentraciones de ácido úrico disminuyen entre un 25-35% por diferentes causas, entre ellas: el aumento en los niveles de estrógenos, la expansión del volumen sanguíneo y el aumento de la tasa de filtración glomerular. Posteriormente, las concentraciones van incrementando progresivamente secundario al aumento en la producción fetal, disminución de la unión con la albúmina y de su eliminación, hasta el final de la gestación donde se alcanzan niveles similares a los de mujeres no embarazadas. (74) Sin embargo, diferentes escenarios se han reportado al comparar los niveles de ácido úrico en gestantes sanas y mujeres no embarazadas. Un estudio publicado en mujeres africanas, reportó mayores niveles en las mujeres embarazadas durante el segundo trimestre gestación que las mujeres no gestantes (8.0 mmol/l vs 5.5 mmol/l, $p < 0.05$). (75) Mientras que un estudio con un mayor tamaño muestral, encontró niveles más bajos de ácido úrico en las gestantes en segundo y tercer trimestre comparado con las mujeres no embarazadas (Segundo trimestre 0.15 +/- 0.03 mmol/L, Tercer trimestre 0.14 +/- 0.02 mmol/L versus 0.29 +/- 0.04 mmol/L en mujeres no embarazadas $p < 0.001$). (76) Otro escenario está representado por los embarazos gemelares. Si los fetos contribuyen a la producción de ácido úrico, el aumento en el número de productos pudiese incrementar los niveles en los embarazos múltiples. Bajo esta hipótesis se han realizado algunos estudios observacionales reportando que las mujeres con embarazos gemelares y en tercer trimestre tenían valores más elevados de ácido úrico que aquellas con embarazos únicos (5.0 ± 0.9 versus 3.7 ± 0.6 mg/dl, $p < 0.01$ y 5.4 ± 1.6 versus 4.7 ± 1.2 mg/dL, $p = 0.001$). (77, 78)

2.3.2 Ácido úrico y Preeclampsia

Teniendo en cuenta la alteración a nivel vascular y renal desencadenada por el ácido úrico, así como la evidencia a partir de estudios observacionales entre éste marcador y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, se ha renovado el interés por estudiar el potencial efecto causal de éste marcador en la preeclampsia dado que las principales

características de ésta patología también se relacionan con cambios a nivel vascular y renal.

Tradicionalmente, se ha descrito que el mecanismo principal para el aumento de ácido úrico en la preeclampsia es debido a la reducción en la excreción renal, secundaria a vasoconstricción sistémica, reducción del flujo sanguíneo renal y disminución de la tasa de filtración glomerular. Pero estas alteraciones se producen cuando el cuadro clínico ya se encuentra instaurado, sugiriendo que la elevación en los niveles correspondería a una consecuencia de la enfermedad. Sin embargo, estudios recientes de niveles elevados de este marcador en células de trofoblasto han mostrado un efecto negativo a nivel placentario. Una concentración dosis dependiente se ha evidenciado, disminuyendo la invasión del trofoblasto así como la integración a la microvasculatura uterina a mayores concentraciones de ácido úrico. (17) Así mismo, un aumento en la secreción de interleuquinas pro inflamatorias a través de la vía del inflammosoma y activación de la caspasa en células de trofoblasto de primer trimestre de la gestación. (16) Adicionalmente, en células vasculares humanas, los niveles elevados de ácido úrico disminuyen la producción de óxido nítrico endotelial a este nivel. (78)

Los niveles elevados de ácido úrico pueden corresponder a una respuesta antiinflamatoria defensiva y apropiada pero si este estado progresa, los efectos negativos sobre la vasculatura predominan. Los niveles elevados de éste marcador se han asociado a un ambiente de estrés oxidativo, caracterizado por el aumento en la producción de radicales libres y disminución en los niveles de sustancias antioxidantes. Este ambiente tiene un impacto negativo sobre la vasculatura materna a nivel sistémico, al activar el endotelio y la producción de sustancias vasoconstrictoras como endotelina y tromboxano, mientras que la producción de vasodilatadores como la prostaciclina y óxido nítrico se encuentra disminuida. Adicionalmente, se ha descrito que el ácido úrico limita la función de la enzima óxido nítrico sintetasa en el endotelio y activa las plaquetas circulantes, hallazgos característicos de esta enfermedad. (23) Estos hallazgos sugieren un efecto negativo del ácido úrico desde el inicio de la gestación, que contribuiría a la aparición de hipertensión y proteinuria al final del embarazo a través de una vía final llamada disfunción endotelial.

2.4 Epidemiología genética

La fusión entre la epidemiología y la genética da como resultado una disciplina estrechamente relacionada con la epidemiología tradicional, que tiene como objetivo estudiar los determinantes genéticos de las enfermedades y el efecto de los factores genéticos y no genéticos en diferentes patologías. En los últimos años, la epidemiología genética se ha popularizado gracias a los avances tecnológicos y potentes métodos estadísticos para el estudio de diversas enfermedades, especialmente de aquellas con un patrón de herencia no mendeliano como es el caso de las enfermedades complejas. (79)

Diversos diseños de estudios observacionales específicos de esta rama de la epidemiología se han descrito: (79-81)

- *Estudios de ligamiento*: tienen como objetivo identificar marcadores específicos en cada cromosoma que se segregan en familias afectadas por una misma enfermedad. Si el marcador estudiado se segrega más de lo esperado en la población a estudio, será identificado como un posible gen asociado con la enfermedad en cuestión. Este tipo de diseño ha sido ampliamente utilizado en el estudio de las enfermedades monogénicas o de herencia mendeliana (afectación de un solo gen, ej: anemia falciforme).
- *Estudios de asociación genética*: En este tipo de estudios, se utilizan los principios estadísticos de los estudios observacionales de asociación. Principalmente, utilizando diseños de casos y controles en poblaciones no relacionadas, se estudia la frecuencia de un marcador o variante genética (ej: SNP's) entre los individuos sanos y afectados por un fenotipo o enfermedad determinada. Estos estudios parten de una hipótesis según la plausibilidad biológica de un gen con una enfermedad determinada, por lo que se seleccionan variantes genéticas en genes específicos. El aumento en la frecuencia de un alelo o genotipo en los casos, puede interpretarse como un incremento en el riesgo de

desarrollar la enfermedad asociado con la presencia de la variante. (82) Este diseño ha sido muy utilizado en el estudio de la preeclampsia. (55) De ésta manera se han identificado mutaciones en los genes que codifican para las enzimas Metilenoetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (NOS_e), entre otros, probándose una asociación de riesgo para el desarrollo de preeclampsia al final de la gestación. (83) Sin embargo, los resultados obtenidos por este tipo de estudios no siempre han podido replicarse y por tanto no se han generado conclusiones firmes y robustas sobre el papel de genes específicos en el desarrollo de la enfermedad. (55)

- *Estudios Ampliados del Genoma (GWAS):* Con el advenimiento de nuevas tecnologías de microarrays (chips), fue posible desarrollar un nuevo tipo de estudio de asociación, en donde a través de plataformas especializadas (Illumina y Affymetrix) se puede escanear el genoma completo de un individuo en busca de alrededor de un millón de variantes genéticas, las cuales pueden asociarse a un cuadro clínico determinado. Para el desarrollo de estos estudios, se define como primer paso el cuadro clínico de interés (desenlaces cuantitativos o cualitativos) y se escoge el test estadístico apropiado para establecer la fuerza de asociación con las variantes genéticas a evaluar. Posteriormente, se define la forma en que se codificará el genotipo (dominante, recesivo, multiplicativo o aditivo) y se definen las variables clínicas de interés para ajustar el análisis. Adicionalmente, el análisis genético debe considerar especialmente la subestructura de la población estudiada como una covariable por la que debe ajustarse el análisis, pues diferencias relacionadas con la etnicidad pueden asociarse con el desenlace por haber estratificación de la población. (84) Debido a que se realizan múltiples comparaciones de asociación, debe corregirse el nivel de significancia, lo que usualmente se hace utilizando la fórmula de Bonferroni:

$$\alpha = \frac{0.05}{k}$$

Donde k es el número de pruebas estadísticas realizadas. Por ejemplo, para un GWAS que evalúe 900.000 SNP's, el nivel de significancia a utilizar es de 0.5×10^{-8} . (84, 85)

En el caso de la preeclampsia, un GWAS publicado en 2012 reportó variantes genéticas (SNP's) asociadas con la enfermedad (rs7579169, $p=3.58 \times 10^{-7}$, OR=1.57 IC95% 1.32-1.87; rs12711941, $p=4.26 \times 10^{-7}$, OR=1.56 IC95% 1.31-1.86), que se encontraban localizadas en el brazo largo del cromosoma 2 en el gen de la inhibina beta B (*INHBB*), sin embargo la importancia funcional de éste gen en la enfermedad aún no es clara. (86)

Finalmente, para poder validar los resultados obtenidos en un GWAS deben poderse replicar en una muestra adicional e independiente. Es decir, repetir el diseño del GWAS y aquellas asociaciones significativas que coincidan con los resultados previos pueden ser interpretadas como efecto replicados. Técnicas como meta análisis de diferentes resultados de GWAS también han sido aplicadas para incrementar el poder estadístico. (87)

2.4.1 Estudios ampliados del genoma en ácido úrico

Se estima que los niveles del ácido úrico tienen una heredabilidad entre el 40 y 70%, por lo que ha resultado de gran interés el estudio de las variantes genéticas asociadas a la elevación de dichos niveles. Un GWAS realizado en población china que incluyó 12,281 personas, tuvo como objetivo evaluar alrededor de novecientos mil SNP's y su asociación con niveles séricos de ácido úrico. Sus resultados fueron replicados en una muestra independiente de 8.830 personas. Los resultados finales reportaron dos loci genéticos (*SLC2A9* $p= 8,98 \times 10^{-31}$ y *ABCG2* $p= 3,34 \times 10^{-42}$) asociados significativamente con los niveles elevados de éste marcador. *SLC2A9* se encuentra localizado en el cromosoma 6 y codifica para un transportador de glucosa (GLUT9) que puede reabsorber ácido úrico en los túbulos renales y *ABCG2* un exportador de ácido úrico que media su excreción renal. (88) Resultados de diferentes GWAS que evalúan poblaciones de distinto origen étnico se exponen en la Tabla 7. Los genes reportados con variantes que presentaron

una significancia estadística están relacionados con el mecanismo de regulación y excreción renal del ácido úrico.

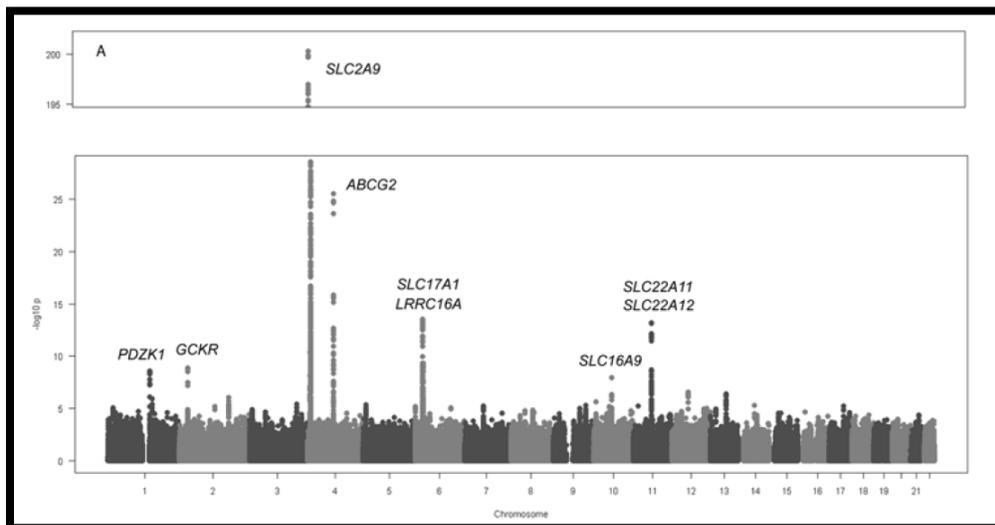
Tabla 7. GWAS sobre ácido úrico

Autor	Etnicidad	n	Niveles (m/h)	Gen	Confusores	p
Charles, 2011 (89)	Africano americanos	1.107	5,02 mg/dl 6,25mg/dl	<i>SLC2A9</i>	Edad, sexo, IMC, TFG, hipertensión, diabetes tipo 2, estratificación de la población.	$1,38 \times 10^{-9}$
Kamatani, 2010 (90)	Asiáticos	14.700	n.r.	<i>SLC22A12</i> <i>SLC2A9</i> , <i>ABCG2</i>	Año de nacimiento, género, estratificación de la población	2.34×10^{-31} , 7.09×10^{-24} , 1.14×10^{-13}
Karns, 2013 (91)	Caucásicos	1.395	265.4mmol/L 361.0 mmol/L	<i>SLC2A9</i>	Edad, sexo	2.33×10^{-19}
Nam-son, 2014 (92)	Asiáticos	1.957	4,30mg/dl 5,67mg/dl	<i>PPP1R12B</i>	n.r.	2.29×10^{-09}
Vorungati, 2013 (93)	Mexicano americanos	632	4,94 mg/dl 6,1mg/dl	<i>SLC2A9</i>	Peso IMC, PA, niveles de triglicéridos, HDL, LDL y colesterol total, glucosa, insulina y fenotipos de la función renal	1.3×10^{-7}
Wallace, 2008 (94)	Caucásicos	1.955	N.R.	<i>SLC2A9</i>	Centro de reclutamiento, edad, edad2, sexo y el IMC.	1.85×10^{-15}

m/h: mujeres/hombres. IMC: Índice de Masa Corporal. TFG: Tasa de Filtración Glomerular. PA: Perímetro abdominal

En esta misma vía, un meta-análisis de GWAS independientes realizado por Kolz, reunió los resultados de 14 estudios independientes para un total de 28.141 individuos europeos caucásicos no relacionados. Este meta análisis reportó 954 SNPs que superaron el umbral de significancia (5×10^{-8}). Los SNP's se agruparon alrededor de nueve loci (Figura 2-5), cuatro de los cuales son los reguladores conocidos de los niveles séricos de ácido úrico: *SLC2A9* ($p=5.2 \times 10^{-201}$), *ABCG2* ($p=3.1 \times 10^{-26}$), *SLC17A1* ($p = 3.0 \times 10^{-14}$) y *SLC22A12* ($p=2.0 \times 10^{-9}$). Además, cinco nuevos loci fueron identificados *SLC22A11* ($p=6.76 \times 10^{-4}$), *GCKR* ($p=1.46 \times 10^{-9}$), *PDZK1* ($p=2.76 \times 10^{-9}$), *LRRRC16A* ($p=8.56 \times 10^{-9}$) y *SLC16A9* ($p=1.1 \times 10^{-8}$). (67)

Figura 2-5 Manhattan plot de GWAS sobre ácido úrico en población caucásica



Tomado de: Kolz et al. (67)

Posteriormente, un meta análisis de 48 GWAS combinados con un total de 110.347 individuos europeos no relacionados y más de dos millones de SNP's investigados, replicó las señales del estudio anterior e identificó 18 nuevos diferentes loci: *PKLR* ($p=6.2 \times 10^{-19}$), *HNF4G* ($p=4.4 \times 10^{-17}$), *ASAH2* ($p=7.4 \times 10^{-17}$), *HLF* ($p=5.4 \times 10^{-17}$), *MUSTN1* ($p=2.6 \times 10^{-16}$), *VEGFA* ($p=8.0 \times 10^{-16}$), *INHBB* ($p=1.6 \times 10^{-10}$), entre otros. (66) Estos loci y marcadores genéticos constituyen una base importante para la construcción de un score alélico que será la variable instrumental para responder la pregunta de investigación en cuestión, a través de la metodología del presente estudio.

2.5 Randomización Mendeliana

La Randomización Mendeliana cuenta con dos definiciones, una con un enfoque genético y otra con un enfoque epidemiológico.

- **Genética:** Se define como la asignación aleatoria de los alelos al momento de la meiosis y recibe su nombre a partir de Gregor Mendel quien planteó los postulados sobre los patrones de herencia, específicamente la ley de la segregación independiente, también conocida como la segunda ley de Mendel:

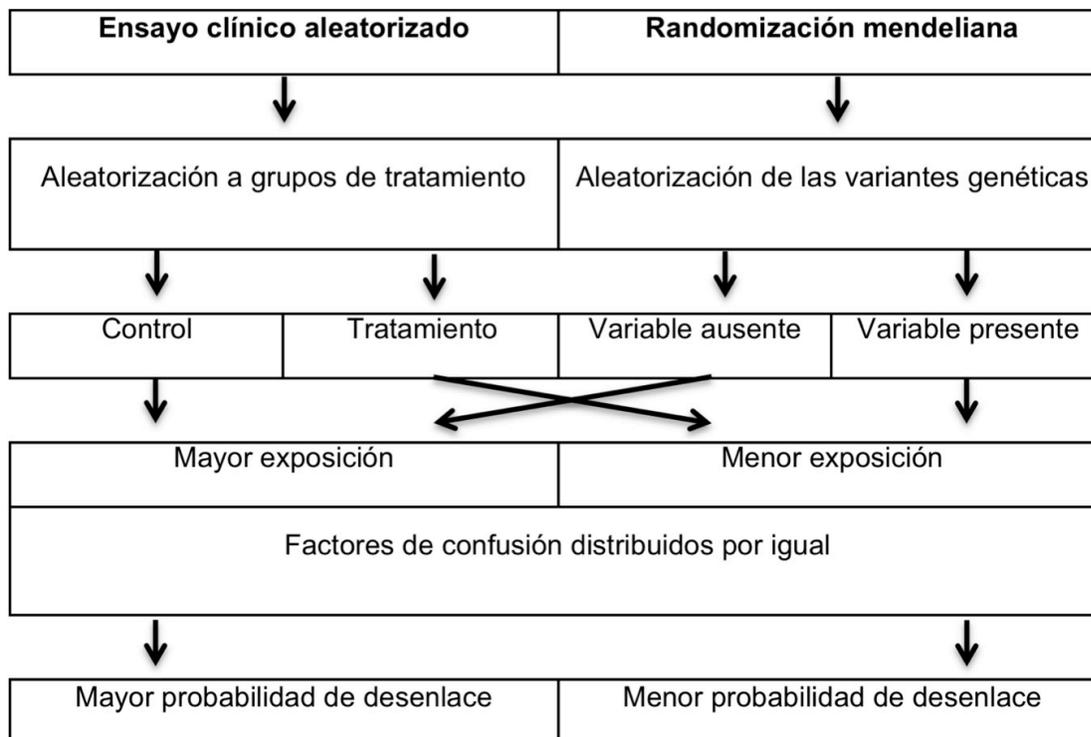
"El comportamiento de cada par de características diferenciales en unión híbrida es independiente de las otras diferencias entre las dos plantas originales". (95)

Por tanto si los alelos se distribuyen de forma aleatoria, podría interpretarse que son independientes de los factores conductuales y ambientales que usualmente confunden las asociaciones epidemiológicas entre un factor de riesgo modificable y un desenlace. Esto, puede ser aprovechado para estudiar la asociación entre un factor de riesgo y un desenlace desde una perspectiva epidemiológica.

- *Epidemiológica:* En el enfoque epidemiológico, la aleatorización al momento de la concepción puede semejar la asignación aleatoria que se realiza en los ensayos clínicos. (Figura 2-6) (96)

En un ensayo clínico aleatorizado, la asignación al azar de la intervención sólo tiene efecto a través del tratamiento recibido, ya que este se encuentra en la vía causal entre la asignación y el desenlace. En un entorno de Randomización mendeliana, esto correspondería a la suposición de que los efectos de una variante genética sobre un desenlace sólo ocurren a través del fenotipo intermedio (factor de riesgo modificable). (97)

Figura 2-6. Comparación entre ensayos clínicos y Randomización mendeliana



Adaptado de: Burgess et al. (98)

En 1986, Martijn Katan fue el primero en plantear este tipo de análisis, incluso antes de que se utilizara el término de Randomización mendeliana como tal. Para la época, se sugería que los niveles bajos de colesterol se asociaban a un mayor riesgo de cáncer. Sin embargo, dicha asociación podría explicarse por causalidad reversa o por factores confusores (como el cigarrillo). Por tanto, Katan planteó que a partir de las variantes del gen de la apolipoproteína E (*APOE*) que se asociaban con diferentes valores de colesterol, si los niveles bajos eran en realidad un factor de riesgo causal para el cáncer, entonces se esperaba que los individuos con el genotipo asociado a colesterol bajo tuviesen mayor riesgo de cáncer. Por el contrario, si existiese causalidad reversa o confusión en la asociación observada en estudios observacionales, entonces no se esperaba ninguna asociación entre el genotipo *APOE* y el cáncer. Si bien Katan no tenía datos para demostrarlo, planteó un diseño de estudio. (96)

El término de Randomización mendeliana fue usado por primera vez para describir un diseño que planteaba evaluar la eficacia del trasplante de médula ósea alogénico con y sin hermano compatible en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. La presencia o no del antígeno leucocitario humano está determinada por la asignación aleatoria de los alelos al momento de la concepción, lo cual permite una comparación aleatorizada y no influida por variables como estadio de la enfermedad y estado general del paciente. La comparación del desenlace entre los dos grupos de pacientes (con y sin hermano compatible), se realizó independiente de si recibieron o no el trasplante, como en una forma de análisis por intención de tratar. (99)

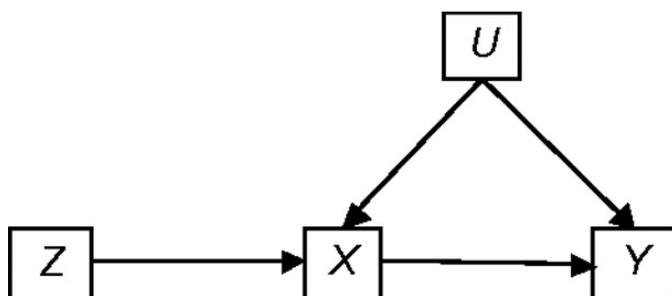
Teniendo esto en cuenta, el principio de Randomización mendeliana puede definirse como un análisis que utiliza las variantes genéticas en estudios observacionales, con el fin de hacer inferencias causales sobre el efecto de una exposición en un desenlace. Dichas variantes genéticas son utilizadas como **variables instrumentales**, las cuales deben cumplir tres asunciones para ser consideradas como tal.

2.5.1 Variables instrumentales

El uso de variables instrumentales inició en los análisis econométricos y posteriormente se implementó en el contexto epidemiológico. Se considera una variables instrumental (Z) a aquella que cumpla las siguientes asunciones (Figura 2-7):

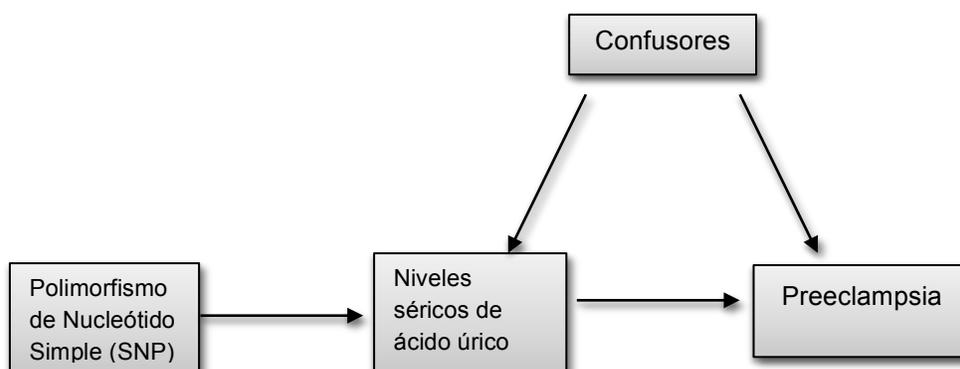
1. Z se asocia con la exposición de interés X (factor de riesgo modificable)
2. Z es independiente de variables de confusión (U) en la asociación de X y el resultado (Y).
3. Z es independiente de Y dado X y los factores de confusión U.

Figura 2-7. Asunciones de la variable instrumental



La variante genética (variable instrumental) la cual se asigna al azar y está presente desde el nacimiento (precediendo el desenlace), se asocia con el resultado de interés (Y) sólo mediante el factor de riesgo o fenotipo intermedio (X). En esta línea causal no están presentes los confusores (U) (aleatorización de los alelos en la meiosis) que usualmente afectan la relación entre las variables X y Y en la epidemiología observacional. De ésta manera, se eliminan los posibles sesgos más comunes en los estudios observacionales (confusión y causalidad reversa), y por tanto se puede estudiar el posible papel causal de un marcador sérico o factor de riesgo modificable (niveles de ácido úrico) y la presencia de un desenlace o enfermedad (preeclampsia) (Figura 2-8).

Figura 2-8. Gráfico directo acíclico sobre la asociación entre ácido úrico y preeclampsia utilizando marcadores genéticos como variables instrumentales



Sin embargo, para que la interpretación de los resultados sea lo más precisa posible, las variables instrumentales deben ser escogidas cuidadosamente. El conocimiento sobre el

efecto biológico de la variante genética sobre un fenotipo intermedio (Z se asocia con X) es primordial para cumplir con la primera asunción de las variables instrumentales. Es por esto que la información obtenida a partir de los GWAS puede ser útil en este paso. Adicionalmente, se han descrito aproximaciones estadísticas como el estimador *F de Cragg Donald* para evaluar la fuerza de asociación entre el instrumento y el fenotipo intermedio, siendo un $F \geq 10$ un punto de corte para seleccionar dichas variantes. (100)

En esta misma vía, cuando se cuenta con múltiples variantes genéticas que se asocian con los niveles de un marcador o múltiples variantes que tienen un efecto pequeño, puede resumirse la información del efecto de cada una de ella a través de un *score alélico* (también conocido como score genético o poligénico) el cual puede utilizarse como una variable instrumental. El score (no ponderado) se calcula como el número total de alelos de riesgo en un individuo o la suma de los pesos ponderados de cada alelo de acuerdo al tamaño de su efecto. Estos scores son especialmente útiles en el estudio de rasgos poligénicos multifactoriales, pues une los efectos pequeños de variantes comunes o variantes raras. Los efectos de la variante genética sobre los valores de un marcador pueden ser estimados internamente (a partir de los datos que se están analizando) o externamente (datos provenientes de otros estudios o conocimiento previo). En cualquier caso, las variantes incluidas en el score deben cumplir con las asunciones de la variable instrumental para mejorar la estimación del efecto causal. La decisión de cuántas y cuáles variantes se incluyen en el score, se sugiere este basado en conocimientos científicos en lugar de pruebas estadísticas. De esta manera, el score puede explicar una considerable proporción en la variación del factor de riesgo modificable o fenotipo intermedio. (101)

- *Estimación del efecto causal*

A través del análisis de Randomización Mendeliana, puede establecerse:

1. Si existe un efecto causal entre una exposición y un desenlace, y
2. El tamaño de dicho efecto.

En la tabla 8 se resumen los principales métodos estadísticos utilizados.

Tabla 8. Métodos estadísticos en Randomización Mendeliana

Método	Características
<i>Paramétricos</i>	
Dos etapas de Mínimos Cuadrados	<p>Se realizan dos etapas de regresión:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Regresión de la exposición en la variable instrumental 2. Regresión del desenlace en la exposición, utilizando los valores estimados en la primera etapa. En desenlaces binarios, se realiza regresión logística en la segunda etapa
Máxima Verosimilitud	<p>Las dos etapas se realizan simultáneamente. Tiene propiedades no sesgadas, de normalidad y eficiencia. Puede ser utilizado en caso de instrumentos débiles ya que la mediana de la distribución del estimador es cercana a la no sesgada.</p>
Métodos Bayesianos	<p>Es un método similar al de máxima verosimilitud, pero el parámetro estimado representa el efecto entre el promedio de la distribución de la exposición en el promedio de la distribución del desenlace.</p>
<i>Semi-paramétricos</i>	
Métodos de momentos generalizados y Modelos de medias estructurales	<p>Estos métodos no identifican un parámetro causal como tal, deben realizarse pasos adicionales para interpretar la información.</p>

Los métodos más utilizados son los paramétricos, entre ellos el de dos etapas de mínimos cuadrados. En este caso, para K variables instrumentales disponibles, siendo los individuos $i=1, \dots, N$ que tienen una exposición x_i , un desenlace y_i y asumiendo un modelo genético aditivo por alelo para las variables instrumentales $k=1, \dots, K$, se obtiene el siguiente modelo para la primera etapa de regresión:

$$x_i = \alpha_0 + \sum_k \alpha_k g_{ik} + \varepsilon_{xi}. \quad (1.0)$$

Al correr el modelo, se obtienen los valores estimados del efecto de la variante genética (VI) en la exposición o fenotipo intermedio, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\hat{x}_i = \hat{\alpha}_0 + \sum_k \hat{\alpha}_k g_{ik} + \varepsilon_{xi}$$

(1.1)

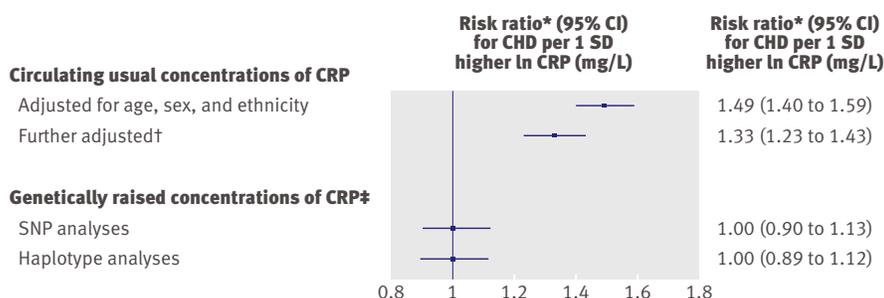
Es importante que esta primera etapa, sea calculada en los controles únicamente. Los valores estimados (\hat{x}) de la exposición (siendo el parámetro de interés β_1) se utilizan en la segunda etapa del análisis, donde se evalúa el efecto de la exposición en el desenlace así:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 \hat{x}_i + \varepsilon_{yi}$$

(2.0)

Este análisis se ha popularizado en la última década, siendo aplicado principalmente en el estudio de enfermedades complejas. Por ejemplo, un estudio publicado por el *C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration (CCGC)*, utilizó cuatro SNP's como variables instrumentales (que explican 98% de la variación en el gen de la CRP en las poblaciones de ascendencia europea) para estimar la asociación entre los niveles elevados de éste marcador y la presencia de enfermedad coronaria. Si bien en los análisis observacionales crudos y ajustados se había observado que la PCR era un marcador de riesgo para desarrollar ésta enfermedad, al realizar el análisis de Randomización mendeliana no se pudo confirmar los mismos hallazgos, Figura 2-9. (12)

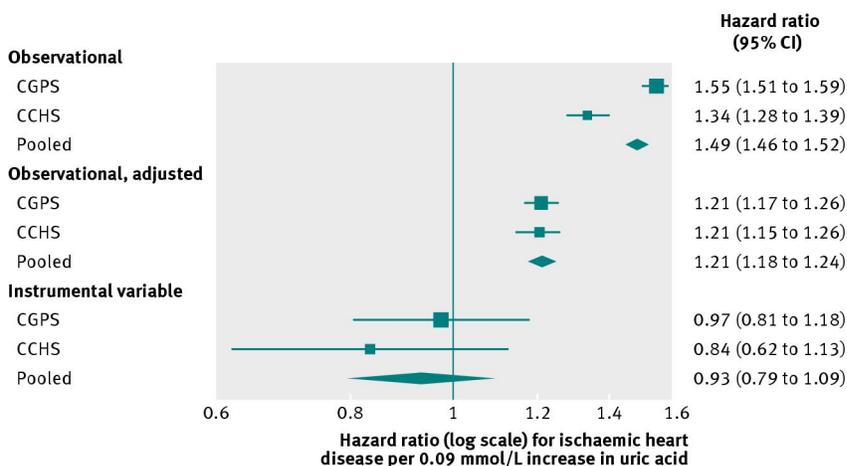
Figura 2-9. Comparación del efecto (observacional vs genético) de los niveles de PCR y la enfermedad coronaria



Tomado de: (12)

Análisis similares se han desarrollado para evaluar el papel del ácido úrico en las enfermedades cardiovasculares. A partir de dos grandes cohortes, 68.674 sujetos fueron evaluados utilizando la variante del gen *SLC2A9* (rs7442295) como variable instrumental. Para el análisis observacional entre el marcador y el riesgo de enfermedad coronaria se reportó un estimador de riesgo, HR 1.49 (IC95% 1.46 -1.52), el cual se atenuaba al ajustar por diferentes variables confusoras HR 1.21 (IC95% 1.18 - 1.24). Sin embargo, el análisis de variable instrumental reportó un HR de 0.93 (IC95% 0.79 - 1.09) para enfermedad coronaria por el aumento en una desviación estándar del ácido úrico, Figura 2-10. (102)

Figura 2-10. Comparación del efecto (observacional y genético) del ácido úrico en la enfermedad coronaria



Tomado de: (102)

- *Limitaciones*

Para una adecuada interpretación de los resultados obtenidos a partir de estudios como los mencionados anteriormente, deben reconocerse y tratar de controlarse algunos obstáculos propios de la distribución genética poblacional, para disminuir la probabilidad de sesgos en la interpretación de los resultados.

1. *Equilibrio de Hardy – Weinberg*: Es un modelo matemático que predice bajo ciertos supuestos la frecuencia de los genotipos en la descendencia a partir de las frecuencias alélicas paternas. Para un SNP's bialélico este principio puede expresarse como:

$$EHW = p^2 + pq + q^2$$

Donde p es la frecuencia del alelo A1 y q la del alelo A2 en una determinada población.

El equilibrio está presente si: el apareamiento de la población es al azar, no hay presencia de mutaciones, no hay migración o emigración, no hay deriva genética: la población es lo suficientemente grande para que los cambios en la frecuencia de alelos debido a procesos aleatorios no juegan un papel observable, no hay selección a favor o en contra de cualquier rasgo. En los grandes estudios poblacionales estas condiciones se cumplen en la mayoría de los casos.

Este modelo puede comprobarse utilizando la prueba de X^2 o el test exacto de Fisher para comparar las frecuencias alélicas observadas y esperadas. Se sugiere realizar la prueba para el equilibrio de Hardy Weinberg sólo en los controles, ya que es posible una violación del principio matemático para los SNP's asociados en los casos debido a un cambio en la frecuencia de los alelos en este grupo. (82)

2. *Estratificación de la población*

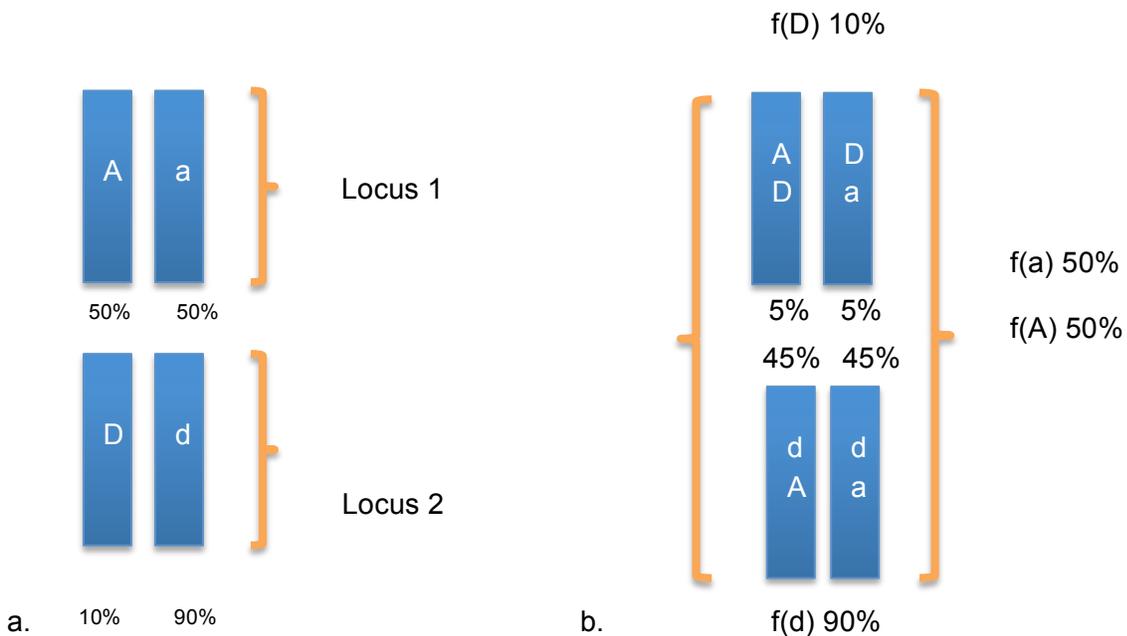
Se refiere a diferencias sistemáticas en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones de una población más grande. Esta situación puede presentarse por diferentes ascendencias debido al apareamiento no aleatorio, la deriva genética o mezcla de la población. Si no se controla de manera adecuada, pueden generarse resultados falsos positivos. Métodos utilizados para controlarla incluyen el Control Genómico y el uso de Componentes Principales para el ajuste de los modelos de regresión. (82)

3. *Desequilibrio de ligamiento*

El equilibrio de ligamiento sucede: "Cuando la frecuencia de cada alelo en los haplotipos es la *misma* que la de cada alelo en el conjunto de la población". Por ejemplo teniendo en

cuenta dos loci, uno polimórfico con alelos A y a, y otro polimórfico con el alelo D (enfermedad) y d (normal) como se observa en la figura 2-11. Hipotéticamente, en una población la frecuencia alélica para el primero de ellos es del 50% (A y a) y 10% para el alelo de enfermedad (D) en el segundo. Sin embargo, conocer las frecuencias alélicas no significa que sepamos la distribución de las combinaciones posibles (AD, Ad, aD, ad). Existe equilibrio de ligamiento cuando después de la recombinación, los haplotipos que contienen el alelo D tienen una frecuencia del 5% cada uno, constituyendo el 10% de la frecuencia alélica conocida antes de la recombinación. (103)

Figura 2-11. Descripción del Equilibrio de ligamiento



Adaptado de: *Nussbaum et al.* (103) . a. Loci 1 y 2 ubicados cercanamente. Frecuencias alélicas para cada uno de ellos. b. Frecuencias de haplotipos en equilibrio de ligamiento después de la recombinación.

Dos loci están en desequilibrio de ligamiento (o en asociación alélica) cuando sus alelos se heredan juntos con más frecuencia de la esperada por el azar. Esto ocurre porque están lo suficientemente cerca en el mismo cromosoma al momento de la recombinación, lo cual hace que no se hereden por separado (sino como un mismo haplotipo). (104)

Continuando con el ejemplo, si todos los cromosomas que tienen el alelo D, también tiene el alelo a y ninguno el alelo A, la frecuencia esperada para aD sería más alta de la esperada.

El desequilibrio de ligamiento puede medirse a través de la siguiente fórmula:

$$D = h - p_1 \times p_2$$

(3.0)

Donde h es la frecuencia poblacional del haplotipo y p_1 y p_2 son las frecuencias de los alelos mayores en el primero y segundo sitio cercano respectivamente. Sin embargo, D puede influenciarse fácilmente por las frecuencias alélicas por lo que otras medidas suelen utilizarse (r^2 y D'). r^2 es la correlación al cuadrado de dos alelos y D' es D escalado a su máximo valor dado las frecuencias alélicas.

$$r^2 = \frac{D^2}{(P_1 P_2 q_1 q_2)}$$

(4.0)

Sus valores van de 0 a 1, siendo 1 un desequilibrio de ligamiento total.

Si $D < 0$:

$$D' = \frac{D}{D_{max}}$$

(5.0)

Si $D > 0$:

$$D' = \frac{D}{D_{min}}$$

(6.0)

2.6 Estudio GenPE

El proyecto GenPE - Genética y Preeclampsia - (www.genpe.org) (13), es un estudio prospectivo de casos y controles que capta gestantes al momento del parto, con y sin preeclampsia en varias instituciones de diferentes ciudades del país (Tabla 9).

Este estudio es desarrollado por el grupo de Estudio Genético de Enfermedades Complejas perteneciente al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de Bucaramanga en alianza con University College London – UCL y London School of Hygiene and Tropical Medicine en Reino Unido, quienes tienen un papel activo en el análisis e interpretación de los datos genéticos.

Tabla 9. Universidades y Hospitales en Estudio GenPE

<i>Ciudad</i>	<i>Universidad</i>	<i>Hospital</i>
Bucaramanga	Universidad Autónoma de Bucaramanga – UNAB (Centro coordinador).	Hospital Local del Norte
	Universidad Industrial de Santander – UIS	Hospital Universitario de Santander - HUS
Cali	Universidad del Valle	Hospital Universitario del Valle
Cartagena	Universidad de Cartagena	Maternidad Rafael Calvo
Medellín	Universidad CES	Hospital General de Medellín Clínica Prado Laboratorio Prolab
	Universidad Pontificia Bolivariana	Clínica Universitaria Bolivariana
Tunja		Hospital San Rafael de Tunja
Bogotá	Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud – FUCS	Hospital San José
	Pontificia Universidad Javeriana	Hospital San Ignacio
Cúcuta	Universidad Autónoma de Bucaramanga - UNAB	Hospital Universitario Erasmo Meoz
Popayán	Universidad del Cauca	Hospital Universitario San José de Popayán

Previa firma de consentimiento informado a las gestantes que aceptan participar (Anexo 1), se les realiza una entrevista y aplica un cuestionario para registrar datos sociodemográficos, antecedentes personales y familiares sobre enfermedades cardiovasculares y preeclampsia (madre y hermanas), consumo de vitaminas prenatales, presencia de infecciones en la gestación actual (vaginosis, infección de vías urinarias, enfermedades de transmisión sexual), consumo de cigarrillo, síntomas premonitorios, edad gestacional al momento de la captación, dos tomas de presiones arteriales separadas de 4 hrs, proteinuria, complicaciones de la preeclampsia, datos del recién nacido (peso, talla, Apgar) y se realizan tomas de sangre para obtener muestras de ADN y suero.

Las muestras y formatos de las pacientes captadas en cada uno de los centros de reclutamiento son almacenados y posteriormente enviados una vez a la semana al centro coordinador (UNAB - Bucaramanga), donde las muestras son alicuotadas y almacenadas a -80 grados centígrados hasta su análisis. Un comité de desenlaces, compuesto por investigadores clínicos y metodológicos pertenecientes al grupo, se reunía periódicamente para validar la inclusión de cada una de las participantes.

Bajo la financiación de la Wellcome Trust Cases Control Consortium (WTCCC) – Reino Unido (105), en el 2008 fue realizado un Genome Wide Association Study (GWAS) utilizando la plataforma Affymetrix 6.0 en pacientes con preeclampsia y controles, con el fin de evaluar alrededor de un millón de marcadores genéticos (SNP's) y su asociación con la presencia de la enfermedad. Al terminar esta primera fase, se realizó una replicación de los resultados del GWAS mediante el uso de Inmunochip, encontrando significancia estadística en varios marcadores genéticos pertenecientes a diferentes vías fisiopatológicas conocidas de la enfermedad (resultados no publicados).

Por otra parte, en la población del estudio GenPE también se realiza la medición y análisis de diferentes marcadores serológicos que tienen plausibilidad biológica con la enfermedad y que puedan comportarse como factores de riesgo o protección para la preeclampsia. Entre ellos: Factores angiogénicos (PIGF, VEGF, sflt-1), metabolitos del

metabolismo lipídico (Colesterol-LDL, Colesterol-HDL, Triglicéridos), marcadores de estrés oxidativo (ácido úrico), marcadores de inflamación (Proteína C Reactiva, Pentraxina 3, Homocisteína) y vitaminas (ácido fólico).

Por tanto, a partir de los marcadores genéticos identificados en esta población junto a la medición de niveles de diferentes marcadores, se dispone de un material valioso en el que se pueden estudiar:

1. Estudios de asociación: evaluando el riesgo de pre-eclampsia según los marcadores séricos.
2. Estudios de asociación genética: a partir de marcadores genéticos que puedan asociarse a mayor riesgo de pre-eclampsia
3. Estudios de causalidad: utilizando marcadores genéticos que influyan niveles de un marcador sérico y que a su vez este marcador aumente el riesgo de tener la enfermedad.

Con el último enfoque, se hace posible el análisis de nuevas técnicas estadísticas utilizadas en la epidemiología genética para comprender de una mejor manera la etiopatología de la preeclampsia y que ésta información pueda usarse en futuro cercano para la implementación de acciones en posibles blancos terapéuticos, para poder disminuir el impacto negativo de ésta condición sobre el estado de salud materno y fetal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Estimar el potencial efecto causal del Ácido Úrico sobre la presencia de Preeclampsia, utilizando variables instrumentales genéticas identificadas en estudios ampliados del genoma, a través de un análisis de Randomización mendeliana en gestantes colombianas captadas entre 2000 y 2012 en 8 ciudades del país.

3.2 Objetivos específicos

Componente observacional:

1. Determinar la asociación entre los niveles séricos de Ácido Úrico y la presencia de preeclampsia en gestantes colombianas.

Componente genético:

1. Identificar las variantes de susceptibilidad genética para los niveles de Ácido Úrico, a partir del estudio de asociación ampliada del genoma humano (GWAS e Inmunochip) en pacientes gestantes colombianas desarrollado con la WTCCC.
2. Determinar la frecuencia y distribución de las variantes genéticas determinantes para Ácido Úrico por etnicidad y localización en población gestante de Colombia.
3. Evaluar el efecto de las variantes genéticas seleccionadas sobre el riesgo de presentar Preeclampsia.
4. Estimar el papel causal del Ácido Úrico en la Preeclampsia mediante el uso de randomización mendeliana a partir de las variantes genéticas identificadas.

4. Metodología

4.1 Diseño

Estudio observacional analítico de casos y controles, desarrollado a partir de la información recolectada en el Proyecto GenPE.

Exposición de interés: niveles séricos de ácido úrico estudiados como variable continua y categórica de acuerdo a la distribución por quintiles del metabolito en los controles.

Definiciones:

Casos: Pacientes primigestantes de más de 20 semanas de gestación, con presencia de hipertensión arterial ≥ 140 y/o 90 mmHg asociado a proteinuria ≥ 300 mg en 24 horas o $\geq 1+$ por tirametría en una muestra aislada sin evidencia de infección del tracto urinario.

De acuerdo al inicio de la preeclampsia, se definió como temprana aquella con presentación antes de las 34 semanas, intermedia entre las 34 y 37 semanas y tardía para aquellas después de las 37 semanas.

Controles: Pacientes primigestantes normotensas al término de la gestación (>37 semanas) sin presencia de proteinuria ($++$ en muestra aislada).

Los datos incluidos en el presente estudio corresponden a casos y controles confirmados.

4.2 Población

- **Población de referencia:** gestantes menores de 26 años, con y sin preeclampsia en Colombia
- **Población blanco:** gestantes menores de 26 años, con y sin preeclampsia que han sido captadas en 12 Instituciones Prestadoras de Servicios de salud en 8

Ciudades de Colombia, quienes aceptaron participar en el estudio GenPE e investigaciones derivadas.

- **Población a estudio:** Pacientes validadas en la base de datos del Estudio GenPE que cumplan los siguientes criterios de elegibilidad

4.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes en la base de datos del Estudio GenPE, que cumplan con la definición de caso o control
- Gestantes con cuantificación de niveles séricos de ácido úrico y medición de marcadores genéticos en estudio ampliado del genoma (GWAS)
- Pacientes que hayan aceptado en su consentimiento informado participar en estudios derivados del estudio GenPE.

4.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con niveles de ácido úrico por debajo del límite de detección de la técnica o sin resultado reportado como tal.

4.2.3 Muestra

- *Selección de la muestra:* Las pacientes que cumplieron los criterios de elegibilidad fueron seleccionadas a través de un muestreo no probabilístico consecutivo y a conveniencia.
- *Estimación del poder:* Teniendo en cuenta, la disponibilidad de 3.251 pacientes para el análisis observacional, asumiendo un nivel de significancia del 95%, una relación caso control 1:1 y una diferencia en la exposición del 5%, se podría estimar un Odds Ratio de hasta 1.22 con un poder del 80%. Cálculo realizado en el programa Epidat 4.1®.

Para el análisis de Randomización Mendeliana, se puede calcular el tamaño de muestra de la siguiente forma: (106)

A partir del método delta para la razón de dos estimaciones, a través de la fórmula:

$$\text{var}(\hat{\beta}_{IV}) = \frac{\text{var}(\hat{\beta}_{GY})}{\hat{\beta}_{GX}}$$

Donde β_{GY} y β_{GX} son los estimados de asociación genética con el desenlace y la exposición, respectivamente. La varianza asintótica del estimador β_{GY} obtenida mediante regresión logística y asumiendo un poder del 80%, con un nivel de significancia del 0.05, prueba de hipótesis a dos colas y un número similar de casos y controles, en el escenario de un desenlace binario se puede resumir:

$$N = \frac{31.39}{\beta_{1s}^2 \rho_{GX}^2}$$

Donde β_{1s} es el tamaño efecto causal al cuadrado por el aumento en una desviación estándar del factor de riesgo y ρ_{GX}^2 la correlación al cuadrado entre la exposición y la variante genética (coeficiente de determinación R^2 de la regresión de la exposición en la variable instrumental).

Teniendo en cuenta, la disponibilidad de 2.674 pacientes para el análisis genético, asumiendo un nivel de significancia del 5%, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.02 entre el score y los niveles de ácido úrico, se podría estimar un efecto causal (OR) de 2.2 con un poder del 82.2%.

Poder calculado a través de la herramienta online <https://sb452.shinyapps.io/power/>

$$P = \frac{n}{R^2}$$

4.3 Medición de ácido úrico

Al momento de ingresar al estudio GenPE, a todas las pacientes se les extrajo sangre de la vena antecubital, usando tubos Vacutainer® de 7 ml sin anticoagulante (Becton Dickinson, EE.UU). Los tubos se dejaron coagular y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos, y el suero obtenido se transfirió a viales en fracciones de 300 uL y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

La cuantificación de los niveles de ácido úrico se realizó entre Junio de 2010 y Julio de 2011 con el método colorimétrico enzimático, el cual tiene una sensibilidad de 0,35 y un intervalo de detección de 2,17 a 23,1 mg/dl en RxImola sistema automatizado (Randox, Antrim, UK). El personal encargado de realizar la medición desconocía la clasificación como caso o control de las gestantes.

4.4 Genotipificación

La extracción de ADN se realizó previamente en el centro coordinador del estudio (Bucaramanga, Colombia), con el kit de QIAamp (QIAGEN®, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, a 1806 casos y 2392 controles. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) en el Reino Unido (2008) para la identificación de marcadores genéticos. Todas las muestras fueron genotipadas utilizando la plataforma Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix®), la cual puede identificar alrededor de 996.000 marcadores genéticos a lo largo de los 22 autosomas.

Se evaluó la calidad del ADN teniendo en cuenta los siguientes criterios: concentración de 50 ng/ml mínimo, falta de degradación, concordancia entre el sexo del fenotipo y genotipo (4 marcadores sexuales). Así mismo, se excluyeron los genotipos con Frecuencia de Alelo Menor <1%, No equilibrio de Hardy Weinberg (HWE $\log p < 10^{-06}$), duplicados, asignación del genotipo (genotype call rate) <0.95 y missingness >0.1.

A partir de ésta información, se identificaron los determinantes genéticos de ácido úrico (SNP's) que servirán para el análisis de variables instrumentales.

4.5 Variables

Las características operativas de las variables medidas en el presente estudio se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Definición operativa de las variables

Variable	Medición	Naturaleza	Escala de medición	Función	Unidades
Edad materna	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	Años
Lugar de captación	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Bucaramanga, Cali, Cartagena, Medellín, Tunja, Bogotá, Cúcuta, Popayan
Raza	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Blanca, Afroamericana, Mestiza, Indígena
Estrato social	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Bajo (<3), Medio-alto (3 o más)
Madre con PE	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Si, No
Hermana con PE	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Si, No
Tabaquismo	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Si, No
Infecciones	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Si, No
Embarazo múltiple	Cualitativa	Discreta	Nominal	Independiente	Si, No
Edad gestacional	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	Semanas
Presión arterial sistólica	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	mmHg
Presión arterial diastólica	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	mmHg
Preeclampsia	Cualitativa	Discreta	Nominal	Dependiente	Si, No
Inicio PE	Cualitativa	Discreta	Nominal	Dependiente	<34 semanas, 34-36.6 semanas, 37 semanas y más
Ácido Úrico	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	2.2 – 10 mg/dL
Quintiles de Ácido Úrico	Cualitativa	Discreta	Ordinal	Independiente	<3.8 mg/dl, 3.81-4.4mg/dl, 4.41-5.0mg/dl, 5.1-5.78mg/dl,

>5.78 mg/dl)					
Score genético sin ponderar	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	11-31
Score genético ponderado por efecto externo	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	0.626-2.610
Score genético ponderado por efecto interno	Cuantitativa	Continua	Razón	Independiente	-1.403- 0.256
Quintiles del score genético sin ponderar	Cualitativa	Discreta	Ordinal	Independiente	11-20, 21, 22-23, 24, 25-31
Quintiles del score genético ponderado por efecto externo	Cualitativa	Discreta	Ordinal	Independiente	<1.432, 1.433-1.642, 1.643-1.806, 1.807-2.004, >2.006
Quintiles del score genético ponderado por efecto interno	Cualitativa	Discreta	Ordinal	Independiente	<-0.841, -0.840- -0.681, -0.680 - -0.539, -0.538- -0.365, >0.365.

4.6 Análisis estadístico

4.6.1 Componente observacional

Las variables continuas se reportaron como medias con sus respectivas Desviaciones Estándar (DE). Las variables cualitativas se reportaron como frecuencias absolutas y relativas. Los datos perdidos para cada variable también fueron reportados. Se realizó un análisis descriptivo para identificar posibles variables de confusión. Las diferencias entre casos y controles fueron reportadas como diferencia de promedios e Intervalos de Confianza 95% (IC95%) estimadas a través de la prueba *t* student con varianzas desiguales para variables cuantitativas y Odds Ratio sin ajustar (OR) e IC95% para las variables cualitativas. Se realizó de ésta manera, pues dichos estimados aportan mayor información que sólo el valor de *p*.

Previo al análisis de asociación, se evaluó el efecto de los valores extremos de ácido úrico en la asociación entre la exposición y el desenlace, mediante regresión logística robusta. Adicionalmente, teniendo en cuenta que en un modelo de regresión logística, la relación funcional de la variable independiente con la dependiente debe ser lineal, se

realizó una regresión no paramétrica denominada Locally Weighted Scatter Plot Smooth (LOWESS) para verificar dicho hallazgo (Anexo 2). (107)

La asociación entre la exposición de interés y el desenlace se realizó mediante regresión logística robusta, reportándose OR e IC95% como medida de efecto. Dichos estimadores se reportan de forma cruda y con ajuste progresivo por variables de confusión. La magnitud de la asociación se evaluó de dos formas, primero con los niveles de ácido úrico estandarizados como variable continua, en donde el OR reportado indica el odds de ser un caso por el incremento en una desviación estándar en los niveles del marcador y posteriormente, el ácido úrico se categorizó en quintiles de acuerdo a la distribución del metabolito en los controles para establecer la forma de la asociación mediante la relación dosis respuesta entre los quintiles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia con una línea de tendencia estimada a través de regresión logística ajustada por la edad materna.

Así mismo, se estudió la asociación de los niveles de ácido úrico con el desenlace de acuerdo al momento de inicio de la enfermedad, definiéndose como temprana (<34 semanas), intermedia (34-36.7 semanas) y tardía (37+ semanas) utilizando un modelo de regresión logística multinomial, sin ajustar y con ajuste progresivo por las variables de confusión identificadas. (108) En este modelo no se realizó ajuste por la edad gestacional dado que esta variable definía el desenlace (momento de inicio) y por tanto el modelo no convergiría. Los resultados de este análisis de asociación son reportados como OR crudos y ajustados por variables de confusión con sus respectivos IC95%.

El análisis fue realizado en Statacorp v. 13.0

4.6.2 Componente genético

- *Variantes genéticas asociadas a niveles de ácido úrico*

Con el objetivo de identificar los potenciales marcadores genéticos a incluir en la construcción el Score genético, se realizaron las siguientes actividades:

- **Revisión de estudios ampliados del genoma en población general:** A través de una búsqueda ampliada de la literatura, utilizando los términos MeSH “Genome-Wide Association Study” AND “Uric acid” se identificaron los estudios que evaluaban la asociación entre marcadores genéticos (SNP’s) y niveles de ácido úrico en poblaciones de diferente origen étnico.
- **Revisión de la información de UCL-LSHTM-Edinburgh-Bristol (UCLEB) consortium:** El Consorcio UCLEB tiene como objetivo el desarrollo de herramientas sobre predicción, análisis de causalidad y desarrollo de fármacos para las enfermedades cardiometabólicas, a partir de la integración de datos sobre el genotipo, biomarcadores y desenlaces cardiovasculares. La información es recolectada a partir de doce cohortes con alrededor de treinta mil individuos reclutados al nacer o en la mitad de la vida y seguimiento prospectivo. (109) Se realizó una revisión de la información disponible sobre el efecto del ácido úrico en enfermedades cardiovasculares para discutir los SNP’s que habían sido identificados por ellos previamente, con el objetivo de complementar la búsqueda.
- **Estudio ampliado del genoma realizado en la población de GenPE:** Previamente, se completó un GWAS en las participantes del estudio GenPE utilizando la plataforma Affymetrix 6.0. La genotipificación incluyó un control de calidad determinado por muestras con: concentración de ADN original de al menos 50ng/ml, ausencia de degradación de DNA, acuerdo entre el sexo fenotípico y el asignados en los cuatro marcadores de iPLEX y concordancia de al menos el 65% de los 26 SNP’s de Affymetrix incluidos en el ensayo Sequenom iPLEX. Posterior al control de calidad, 1.806 casos y 2.392 controles se incluyeron en el análisis de asociación. Se excluyeron los genotipos con Frecuencia de Alelo Menor <0.01%, pérdida de información <0.1, asignación de genotipo <0.95, desviación significativa del Equilibrio de Hardy Weinberg y duplicados.

A través del software *PLINK* se realizó el análisis de la asociación entre los SNP’s y los niveles de ácido úrico esta población. Los resultados se reportaron mediante gráficos *Mahattan* y *Quantile-Quantile (Q-Q)* sin ajustar y ajustados por dos componentes principales, para controlar por estratificación de la población. El *Manhattan plott* grafica el

valor de p (\log_{10}) obtenido para cada SNP en el eje de las Y y los 22 cromosomas en el eje de las X. Se denomina “hit” a los niveles de p por encima del valor mínimo de significancia establecido después de la corrección por múltiples comparaciones a través del método de Bonferroni ($p 0.05 \times 10^{-8}$). Los Q-Q *plots* grafican la distribución observada de los SNP's versus la esperada para determinar si existe estratificación de la población.

De todos los SNP's encontrados, se verificaron aquellos que hubiesen sido genotipificados en el GWAS de GenPE y existiese información disponible en la base de datos. Posteriormente, se realizó una búsqueda de SNP's proxy utilizando la herramienta *SNP Annotation and Proxy Search* para complementar la información de aquellos marcadores que no se habían medido directamente en la población de GenPE. Se tomó como criterio de selección, marcadores proxys un DL >0.8 respecto al marcador no medido. (110) Para cada SNP encontrado en la búsqueda anterior, se reportó el cromosoma, gen y su valor p reportado en la literatura.

- *Construcción del score genético*

Dada la cantidad de SNP's relacionados con los niveles de ácido úrico identificados en el paso previo, se construyó un score genético el cual permitiera resumir la información en una sola variable instrumental.

Primero, se seleccionó un SNP de cada región, teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Medición directa en la población de GenPE
- Mayor R^2 con el SNP de referencia reportado en la literatura
- La menor distancia (kb) respecto al SNP de referencia

Posteriormente, se evaluó el DL entre los SNP's preseleccionados y aquellos con un DL >0.5 fueron excluidos. Para cada uno de los SNP's incluidos dentro del score alélico se describió la frecuencia del alelo del efecto, la frecuencia de alelo menor reportada en la

literatura y la hallada en la población de GenPE, el efecto (β) del SNP sobre los niveles del marcador de forma externa (GWAS en población general) e interna (GenPE). El efecto interno del SNP sobre los niveles de ácido úrico fue calculado en el grupo de los controles a través de un modelo de regresión lineal sin ajustar para evitar que la presencia de enfermedad produjera alguna alteración en la magnitud de la asociación entre el genotipo y el marcador. En este mismo grupo, se estimó el equilibrio de Hardy Weinberg para las variantes seleccionadas. Así mismo, se presenta la relación de cada SNP individual (β) con los niveles de ácido úrico, la cual fue estimada a través de un modelo de regresión lineal simple. Se asumió un modelo genético aditivo (Homocigoto para el alelo silvestre, Heterocigoto y Homocigoto para el alelo mutado), en donde el incremento en un alelo de riesgo en el genotipo produce el cambio de una unidad de ácido úrico (mg/dl).

- *Asunciones de la variable instrumental*

Z (Score) está asociado con la exposición (Niveles de ácido úrico): La relación entre la variable instrumental y el fenotipo intermedio se estudia a través del efecto del score como variable continua y categorizada en quintiles sobre los niveles de ácido úrico, estimado mediante regresión lineal ajustada por componentes principales. Dicho análisis se presenta sin ponderar (suma de los alelos de riesgo), ponderada por efecto externo (multiplicación de cada genotipo por el coeficiente reportado en los estudios de referencia) e interno (multiplicación de cada genotipo por el coeficiente obtenido a través de la regresión lineal). En cada caso, se reporta el valor β , IC95%, valor p y R^2 como medida de la proporción de la varianza en los niveles de ácido úrico explicado por el score.

Z (Score) es independiente de variables de confusión (U) en la asociación la exposición (Niveles de ácido úrico) y el resultado (Preeclampsia): Se estimó la asociación entre el score y la edad a través de regresión lineal ajustada por componentes principales describiéndose el coeficiente e IC95%. Así mismo, entre el score y consumo de cigarrillo mediante regresión logística reportándose como medida de efecto el coeficiente (log odds) e IC95%.

Z (SNP) no afecta el desenlace (Preeclampsia), excepto por la vía de la exposición:

Se estimó el coeficiente (log odds) e IC95% para el score genético sin ponderar, ponderado por efecto externo e interno sobre el riesgo de preeclampsia, a través de regresión logística.

- *Análisis de Randomización Mendeliana*

Se realizó un análisis de Randomización mendeliana a través del método de dos etapas de regresión. En la primera parte, se modeló mediante regresión lineal la asociación entre el score como variable independiente y los niveles del marcador como desenlace en la población de controles, ajustando por componentes principales para evitar estratificación de la población. Posteriormente, se utilizaron los coeficientes de ácido úrico estimados en la regresión lineal como variable independiente para estudiar su asociación con la presencia de preeclampsia a través de una regresión logística. Se reporta el OR e IC95% como estimador final indicando la cuantificación del potencial efecto causal por el aumento de una unidad de ácido úrico en el riesgo de desarrollar preeclampsia, dado el análisis a través de variables instrumentales.

El análisis fue realizado en Statacorp v. 13.0

5. Resultados

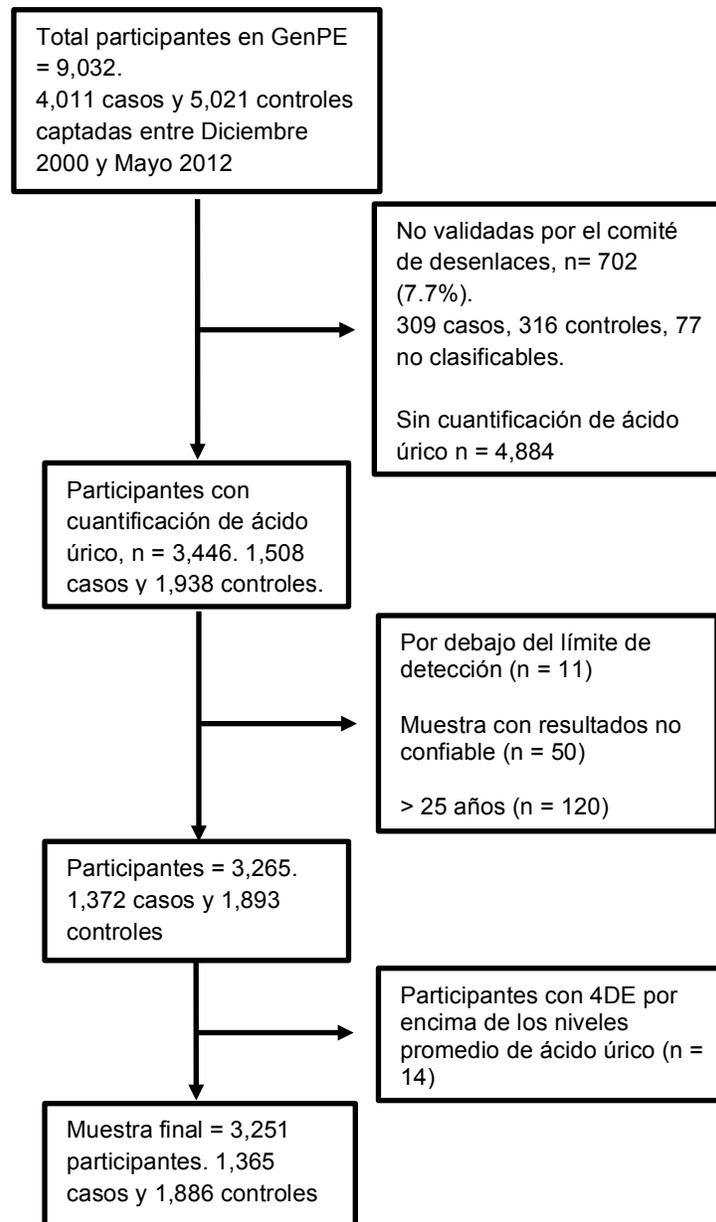
A partir de la base de datos del Estudio GenPE, se identificaron 3.265 gestantes que cumplían los criterios de elegibilidad, como se observa en la Figura 5-1.

De las pacientes con cuantificación de ácido úrico, se excluyeron 61 muestras que tenían un resultado no confiable o por debajo de los límites de detección. Adicionalmente, 14 pacientes presentaron valores extremos del marcador (4DE por encima de la media, correspondiendo a 7 casos y 7 controles), alterando la distribución normal del metabolito como se observa en la Figura 5-2.

Dichas pacientes fueron excluidas del análisis porque podrían generar una interpretación errónea de la forma de la asociación entre el desenlace y la exposición, adicionalmente su exclusión no producía cambios considerables en los estimadores obtenidos a través de los análisis de regresión logística. (Anexo 2)

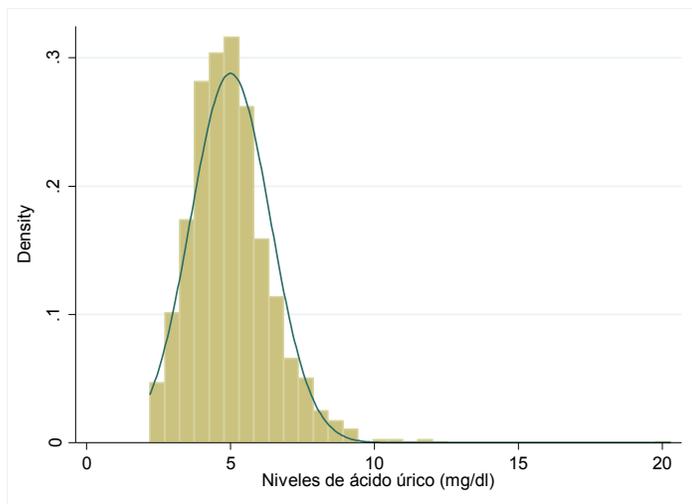
La ciudad con mayor captación de pacientes fue Cartagena (41.1%), seguida de Bucaramanga (23.0%) y Medellín (21.1%).

Figura 5-1. Flujo de pacientes incluidas en el análisis de ácido úrico y preeclampsia



*4DE: Cuatro desviaciones estándar

Figura 5-2. Histograma de niveles de ácido úrico en toda la población



5.1 Componente observacional

En la tabla 11, se describen las características de las gestantes incluidas en el estudio. La mayor proporción de gestantes reportaron ser de raza mestiza y estrato socioeconómico bajo; en aquellas de raza indígena, se presentó mayor proporción de gestantes con preeclampsia.

Los casos presentaron una menor edad gestacional y diferencias en los valores de presión sistólica y diastólica como era de esperarse, con respecto a los controles. Así mismo, en las pacientes con preeclampsia se reportó mayor frecuencia de antecedente materno y de hermana con el mismo desenlace en sus gestaciones. El número de embarazos múltiples fue bajo en toda la población, pero éste hallazgo se presentó con más frecuencia en los casos. La presencia de infección en el embarazo actual y tabaquismo no presentaron una diferencia significativa entre los grupos.

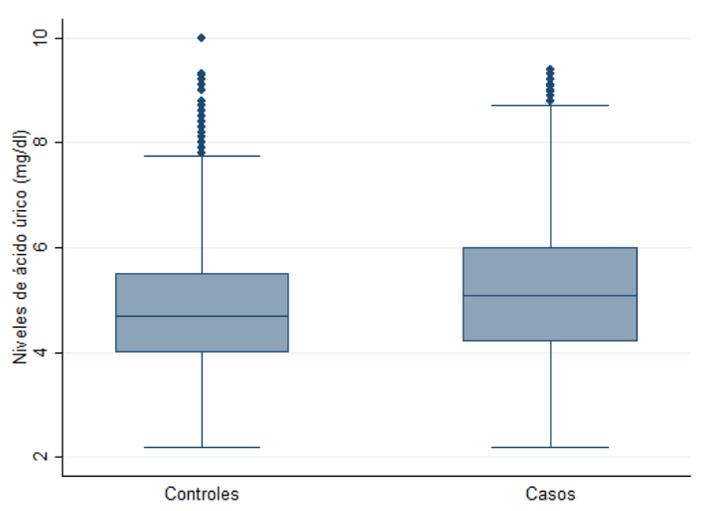
Tabla 11. Características socio demográficas y clínicas de las participantes

Variable	Casos (n= 1,365)	Controles (n= 1,886)	Diferencia del promedio (IC95%)*
Edad (años)**	19.3 (3.1)	18.7 (2.8)	-0.6 (-0.80, -0.39)
Edad Gestacional (semanas)**	36.6 (3.4)	39.1 (1.1)	2.5 (2.38, 2.76)
Presión arterial sistólica (mmHg)**	147.7 (11.6)	110.9 (7.6)	-36.8 (-37.5, -36.0)
Presión arterial diastólica(mmHg)**	96.4 (8.8)	68.5 (6.3)	-27.8 (-28.4, -27.3)
			OR (95%CI)**
Raza			
Mestiza	969 (70.9%)	1410 (74.7%)	Referencia
Blanca	237 (17.3%)	294 (15.5%)	1.17 (0.97, 1.41)
Afroamericano	132 (9.6%)	153 (8.1%)	1.25 (0.98, 1.60)
Indígena	13 (0.9%)	6 (0.3%)	3.15 (1.19, 8.33)
No dato	13 (0.9%)	23 (1.2%)	
Estrato socioeconómico			
Bajo (<3)	1280 (93.7%)	1768 (93.7%)	0.94 (0.66, 1.32)
Medio- Alto (3 o más)	60 (4.4%)	78 (4.1%)	
No dato	25 (1.8%)	40 (2.1%)	
Madre con PE			
Si	209 (15.3%)	130 (6.8%)	1.11 (1.02, 1.21)
No	874 (64.0%)	1363 (72.2%)	
No dato	12 (0.8%)	6 (0.3%)	
Hermana con PE			
Si	130 (9.5%)	94 (4.9%)	1.14 (0.98, 1.31)
No	663 (49.1%)	871 (46.0%)	
No aplica***	483 (35.3%)	809 (42.9%)	
No dato	15 (1.1%)	16 (0.8%)	
Infecciones			
Si	868 (63.5%)	1189 (63.0%)	1.04 (0.90, 1.19)
No	469 (34.3%)	665 (35.2%)	
No dato	5 (0.3%)	4 (0.2%)	
Tabaquismo			
Si	24 (1.7%)	49 (2.6%)	0.67 (0.41, 1.10)
No	1328 (97.2%)	1828 (96.9%)	
No dato	13 (0.9%)	9 (0.4%)	
Embarazo múltiple			
Si	35 (2.5%)	4 (0.2%)	12.38 (4.39, 34.91)
No	1330 (97.4%)	1882 (99.7%)	
No dato	0	0	

*Las diferencias en los promedios entre casos y controles fueron calculadas mediante la prueba t para varianzas desiguales. **Para las variables categóricas, se calcularon OR no ajustados mediante regresión logística siendo los controles el grupo de referencia. ***No aplica: la paciente no tiene hermanas o la hermana de la paciente no ha tenido hijos. Infecciones hace referencias a vaginosis, infección de vías urinarias, enfermedades de transmisión sexual y otras. PE: preeclampsia. Madre con PE hace referencia a la madre de la participante incluida en el estudio.

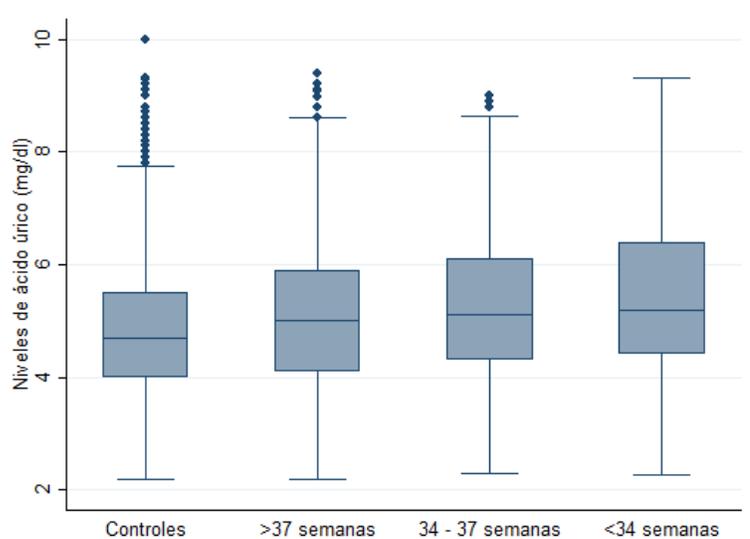
La distribución de los niveles del ácido úrico entre casos y controles se expone en la figura 5-3. Los casos presentaron niveles más elevados del metabolito (5.17mg/dl, DE 1.37) que los controles (4.82mg/dl, DE 1.23).

Figura 5-3. Niveles de ácido úrico entre casos y controles



Así mismo, de acuerdo al momento de inicio de la enfermedad, las gestantes con preeclampsia antes de la semana 34 presentaron mayores niveles que los demás grupos (5.41mg/dl, DE 1.45) (Figura 5-4).

Figura 5-4. Niveles de ácido úrico por momento de inicio de la preeclampsia



Se evidencia una relación lineal positiva entre los niveles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia, especialmente para los dos quintiles más altos (OR 1.34, IC95% 1.07-1.67 y OR 2.07, IC95% 1.67-2.58) comparados con el de referencia, así como una tendencia a través de los quintiles estadísticamente significativa ajustada por la edad materna (Figura 5-5).

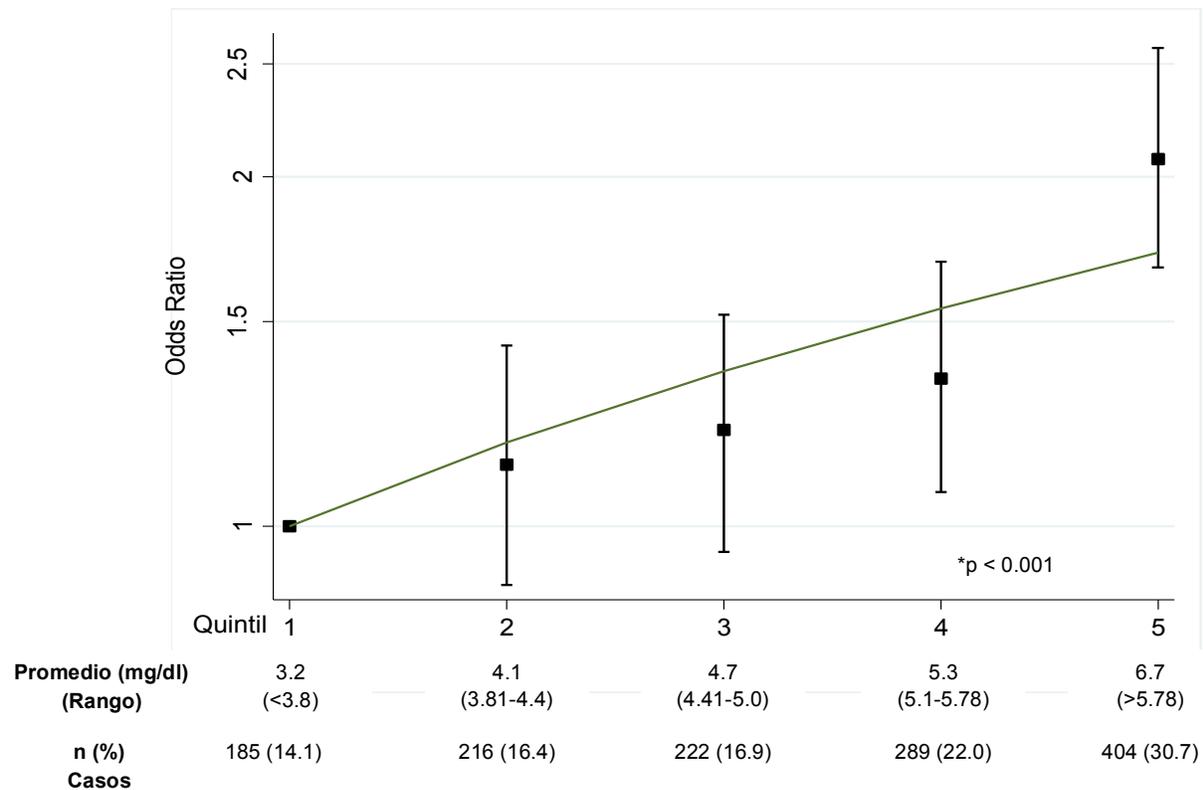


Figura 5-5. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia

**p* representa la tendencia a través de los quintiles ajustado por edad materna. OR e IC95% se presentan en escala logarítmica.

En la tabla 12 se observa la distribución por quintiles de los niveles de ácido úrico entre casos y controles. Con el ajuste progresivo se evidencia la existencia de confusión sin embargo, se observa una asociación de riesgo entre la exposición a los niveles de ácido úrico en el quintil más alto y la presencia de preeclampsia en el modelo con ajuste completo.

Tabla 12. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia

Ajuste	Controles n	Casos n	OR (IC 95%)
Sin ajuste			
<3.8 mg/dl	404	215	Referencia
3.81-4.4mg/dl	372	224	1.13 (0.89, 1.43)
4.41-5.0mg/dl	364	235	1.21 (0.96, 1.53)
5.1-5.78mg/dl	374	270	1.35 (1.08, 1.70)
>5.78 mg/dl	371	421	2.13 (1.71, 2.64)
Ajuste mínimo*			
<3.8 mg/dl	401	214	Referencia
3.81-4.4mg/dl	367	220	0.96 (0.73, 1.26)
4.41-5.0mg/dl	362	230	1.01 (0.76, 1.33)
5.1-5.78mg/dl	369	263	1.13 (0.86, 1.48)
>5.78 mg/dl	364	413	1.73 (1.33, 2.24)
Ajuste completo**			
<3.8 mg/dl	389	211	Referencia
3.81-4.4mg/dl	361	218	0.96 (0.72, 1.25)
4.41-5.0mg/dl	349	225	1.00 (0.75, 1.32)
5.1-5.78mg/dl	360	254	1.13 (0.86, 1.49)
>5.78 mg/dl	353	393	1.74 (1.33, 2.27)

*Edad materna, edad gestacional, centro de captación y etnicidad.

**Ajuste mínimo más fecha de reclutamiento, embarazo múltiple, tabaquismo, estrato socioeconómico e infecciones en el embarazo actual.

En esta misma vía, cuando se evaluó la asociación entre los niveles del marcador y el momento de inicio de la preeclampsia, en los casos con menos de 34 semanas la fuerza de la asociación fue mayor que en las gestantes con preeclampsia intermedia o tardía, al comparar el quintil más alto con el de referencia en el ajuste de todas las variables de confusión (Tabla 13).

Tabla 13. Asociación entre los quintiles de ácido úrico y momento de inicio de la preeclampsia

Ajuste	OR (IC95%)		
	37+ semanas	34-36 semanas	<34 semanas
Sin ajuste			
<3.8 mg/dl	Referencia	Referencia	Referencia
3.81-4.4mg/dl	1.02 (0.78, 1.34)	1.24 (0.80, 1.93)	1.56 (0.92, 2.65)
4.41-5.0mg/dl	0.98 (0.74, 1.29)	1.78 (1.18, 2.70)	1.55 (0.91, 2.64)
5.1-5.78mg/dl	1.21 (0.93, 1.57)	1.55 (1.01, 2.37)	1.81 (1.08, 3.03)
>5.78 mg/dl	1.72 (1.34, 2.21)	2.78 (1.88, 4.09)	3.30 (2.05, 5.29)
Ajuste mínimo*			

<3.8 mg/dl	Referencia	Referencia	Referencia
3.81-4.4mg/dl	0.98 (0.74, 1.29)	1.15 (0.73, 1.81)	1.43 (0.83, 2.45)
4.41-5.0mg/dl	0.97 (0.73, 1.29)	1.56 (1.01, 2.39)	1.29 (0.75, 2.23)
5.1-5.78mg/dl	1.20 (0.92, 1.58)	1.31 (0.84, 2.03)	1.40 (0.82, 2.38)
>5.78 mg/dl	1.76 (1.36, 2.29)	2.23 (1.49, 3.35)	2.39 (1.46, 3.92)
Ajuste completo**			
<3.8 mg/dl	Referencia	Referencia	Referencia
3.81-4.4mg/dl	0.96 (0.73, 1.27)	1.10 (0.70, 1.74)	1.39 (0.81, 2.40)
4.41-5.0mg/dl	0.97 (0.73, 1.30)	1.54 (0.99, 2.38)	1.27 (0.73, 2.22)
5.1-5.78mg/dl	1.22 (0.92, 1.61)	1.23 (0.78, 1.93)	1.25 (0.73, 2.16)
>5.78 mg/dl	1.78 (1.36, 2.33)	2.14 (1.41, 3.24)	2.32 (1.41, 3.82)

*Edad materna, centro de captación y etnicidad. n=3,203. **Ajuste mínimo más fecha de reclutamiento, embarazo múltiple, tabaquismo, estrato socioeconómico e infecciones en el embarazo actual, n=3,113. En el análisis por subgrupo de desenlace, la variable edad materna no se incluyó en el modelo porque define el desenlace y por tanto el modelo no convergía.

Por otra parte, estudiando la asociación entre la presencia de preeclampsia y los niveles de ácido úrico como variable continua, se observa una atenuación progresiva de la fuerza de la asociación, sin embargo en el modelo con ajuste por todas las variables de confusión, el marcador aún se comporta como un factor de riesgo para preeclampsia al final de la gestación (Tabla 14). En el ajuste de la regresión, la edad gestacional fue la variable que más influyó en la asociación de interés.

Tabla 14. Asociación entre el ácido úrico y la presencia de preeclampsia en un modelo de regresión logística acumulativo

Ajuste	Casos	Controles	OR (95% CI)*	p
Sin ajustar	1,365	1,886	1.31 (1.22, 1.41)	<0.001
Más edad materna	1,365	1,886	1.30 (1.21, 1.40)	<0.001
Más edad gestacional	1,352	1,886	1.19 (1.10, 1.30)	<0.001
Más raza	1,340	1,863	1.20 (1.10, 1.30)	<0.001
Más sitio de reclutamiento	1,340	1,863	1.21 (1.11, 1.32)	<0.001
Más fecha de captación	1,340	1,863	1.23 (1.12, 1.34)	<0.001
Más tabaquismo	1,328	1,854	1.23 (1.13, 1.35)	<0.001
Más embarazo múltiple	1,328	1,854	1.23 (1.13, 1.35)	<0.001
Más ESE bajo	1,304	1,815	1.21 (1.11, 1.33)	<0.001
Más infecciones	1,301	1,812	1.21 (1.11, 1.33)	<0.001

*OR indica el *odds* de ser un caso por el incremento en 1 DE en los niveles de ácido úrico. ESE: Estrato Socioeconómico

De acuerdo al momento de inicio de la preeclampsia, se puede observar una tendencia con mayor fuerza de asociación entre los niveles de ácido úrico y las gestantes con preeclampsia temprana (OR ajustado 1.38, IC95% 1.18, 1.60) que aquellas con intermedia (OR ajustado 1.29 IC95% 1.13, 1.47) o tardía (OR ajustado 1.22 IC95% 1.11, 1.34), Figura 5-6, sin embargo, los intervalos de confianza se superponen en los diferentes momentos de inicio de la enfermedad.

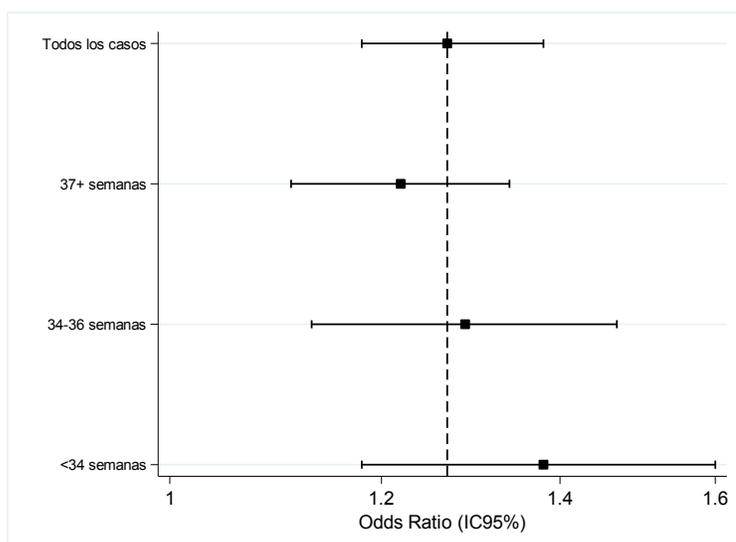


Figura 5-6. Asociación entre niveles de ácido úrico y el inicio de preeclampsia

Regresión multinomial ajustada por Edad materna, centro de captación, etnicidad fecha de reclutamiento, embarazo múltiple, tabaquismo, estrato socioeconómico e infecciones en el embarazo actual. OR e IC95% se presentan en escala logarítmica.

5.2 Componente genético

- *GWAS en población de GenPE*

En la tabla 15, se presenta el número de SNP's genotipificados por cromosoma en el estudio ampliado del genoma en GenPE, después del control de calidad.

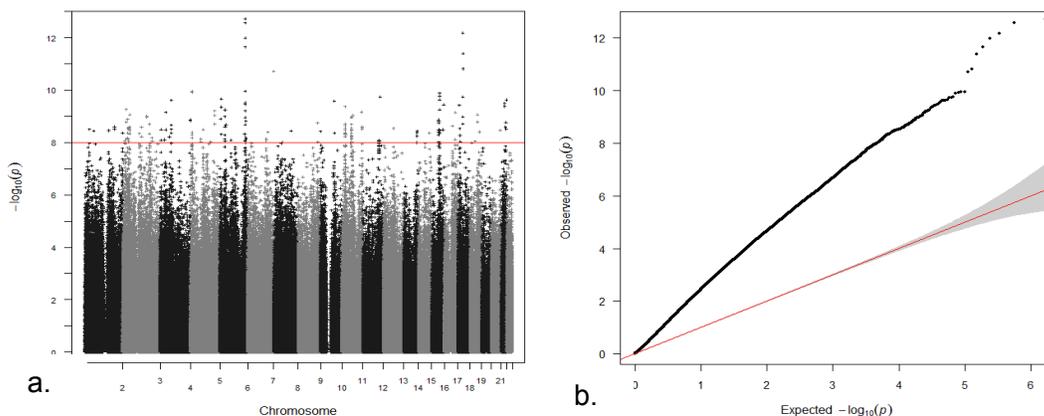
Tabla 15. SNP's genotipificados en el GWAS de GenPE

Cromosoma	Número de SNPs
1	69,114
2	71,767
3	58,860
4	54,386
5	54,946
6	54,653
7	45,654
8	47,133
9	40,301
10	46,919
11	43,369
12	41,327
13	33,333
14	27,410
15	25,125
16	27,003
17	20,036
18	25,853
19	11,559
20	22,187
21	12,244
22	11,356
Total	844,755

De las 3.251 pacientes incluidas en el análisis observacional, 536 no tenían datos de genotipificación, por lo que el análisis genético se realizó con un total de 2.715 gestantes (1.111 casos y 1.604 controles).

El análisis de asociación entre los marcadores genéticos medidos en el GWAS de la población de GenPE y los niveles de ácido úrico, reportó múltiples hits de asociación ($p < 0.05 \times 10^{-8}$) entre diferentes SNP's para con los niveles de ácido úrico a lo largo de los 22 autosomas en el análisis sin ajustar, sin embargo en el Q-Q plott (figura 5-7 a) se evidencia una desviación entre el valor observado y esperado para la distribución de los marcadores en la población estudiada, sugiriendo la presencia de confusión por estratificación de la población.

Figura 5-7. Manhattan y Q-Q plott del estudio ampliado del genoma en las gestantes del estudio GenPE sin ajustar

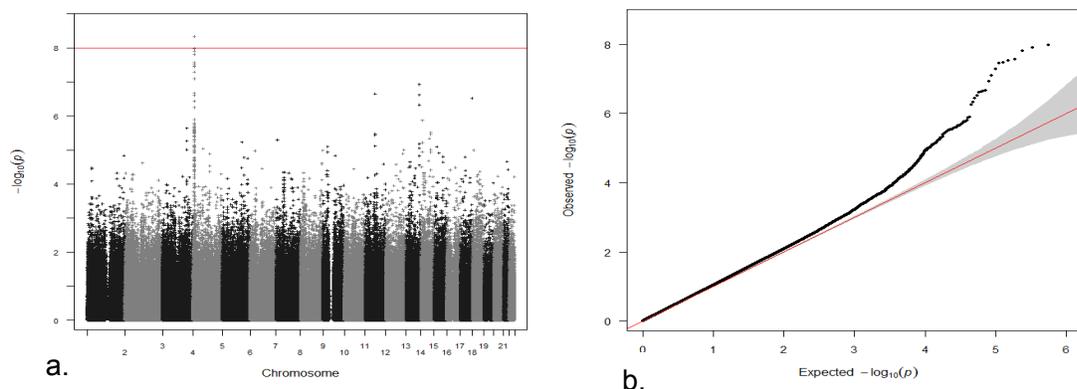


a. Manhattan plott sin ajustar para los niveles séricos de ácido úrico. b. Q-Q plott plott sin ajustar para los niveles séricos de ácido úrico en las gestantes del estudio GenPE.

El análisis de asociación ajustando por dos componentes principales se observa en la figura 5-8 a. Después de dicho ajuste, se observó sólo un hit localizado en el cromosoma 4, el cual permaneció por encima del nivel de significancia establecido ($p < 0.05 \times 10^{-8}$) para este GWAS. En éste cromosoma se encuentra ubicado el gen *SLCA29* el cual ha reportado los SNP's con mayor significancia en los estudios publicados previamente.

Adicionalmente, el Q-Q plott mostró corrección de la desviación entre el valor observado y esperado para la distribución de los SNP's en la población (figura 5-8 b).

Figura 5-8 Manhattan y QQ plott del estudio ampliado del genoma en las gestantes del estudio GenPE ajustado por componentes principales



- a. Manhattan plott ajustado por componentes principales para los niveles séricos de ácido úrico. b. Q-Q plott ajustado por componentes principales para los niveles séricos de ácido úrico en las gestantes del estudio GenPE.

▪ *Búsqueda de la literatura y SNP's proxies*

En la tabla 16 se describen los genes y SNP's asociados a niveles de ácido úrico reportados en la literatura. A través de las diferentes búsquedas se identificaron 77 marcadores genéticos en total (33 de GWAS realizados en población caucásica, 16 de GWAS realizados en poblaciones de diferentes orígenes étnicos y 28 del consorcio UCLEB, Anexo 4). Sin embargo, 11 SNP's se encontraron más de una vez en las diferentes fuentes.

Tabla 16. Genes y SNP's asociados a niveles de ácido úrico

Cromosoma	Gen	Nombre	SNP's
1			rs7442295
2			rs734553
3	4	SLC2A9 Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9	rs16890979
4			rs12498742
5			rs6449213
6			rs11722228

7	4	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	rs2231142
8	11	SLC22A11	Solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter), member 11	rs2078267
9				rs17300741
10	6	SLC17A1	Solute carrier family 17 (organic anion transporter), member 1	rs1165151
11				rs1183201
12	6	LRRC16A	Leucine rich repeat containing 16A	rs742132
13	1	PDZK1	PDZ domain containing 1	rs1471633
14				rs12129861
15	11	SLC22A12	Solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter), member 12	rs478607
16				rs505802
17	2	GCKR	Glucokinase (hexokinase 4) regulator	rs1260326
18				rs780094
19	10	SLC16A9	Solute Carrier Family 16, Member 9	rs12356193
20				rs1171614
21	10	DIP2C	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C	rs877282
22	6	SLC17A3	Solute Carrier Family 17 (organic anion transporter), member 3	rs1165205
23	6	RREB1	Ras responsive element binding protein 1	rs675209
24	12	INHBC	Inhibin, beta C	rs3741414
25				rs1106766
26	1	TRIM46	Tripartite motif containing 46	rs11264341
27	2	INHBB	Inhibin, beta B	rs17050272
28	2	ORC4	Origin recognition complex, subunit 4	rs2307394
29	3	SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1	rs6770152
30	5	TMEM171	Transmembrane protein 171	rs17632159
31	6	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	rs729761
32	7	BAZ1B	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	rs1178977
33	7	PRKAG2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	rs10480300
34	8	STC1	Stanniocalcin 1	rs17786744
35	8	HNF4G	Hepatocyte nuclear factor 4, gamma	rs2941484
36	10	A1CF	APOBEC1 complementation factor	rs10821905
37	11	OVOL1	Ovo-like 1(Drosophila)	rs642803
38	12	ATXN2	Ataxin 2	rs653178
39	15	UBE2Q2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2	rs1394125
40	15	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	rs6598541
41	16	NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	rs7193778
42	16	MAF	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	rs7188445
43	17	HLF	Hepatic Leukemia Factor	rs7224610
44	17	BCAS3	Breast Carcinoma Amplified Sequence 3	rs2079742
45	17	QRICH2	Glutamine Rich 2	rs164009

46	6	SLC22A7	Solute Carrier Family 22 (organic anion transporter), member 7	rs4149178
47	1	ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	rs4970988
48	12	ACVRL1	Activin A Receptor Type II-Like 1	rs7976059
49	12	B3GNT4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	rs7953704
50	16	IRF8	Interferon regulatory factor 8	rs1021479
51	10	RPL5P27, ENO4	Ribosomal protein L5 pseudogene 27, Enolase family member 4	rs10490911
52	8	RPL32P19, MSR1	Ribosomal protein L32 pseudogene 19, Macrophage scavenger receptor 1	rs10503564
53	5	RGNEF, ENC1	Rho guanine nucleotide exchange factor 28, Ectodermal-neural cortex 1	rs10515180
54	4	C4ORF33	Chromosome 4 open reading frame 33	rs10518558
55	6	RPSAP43, FRK	Ribosomal protein SA pseudogene 43, Fyn-related Src family tyrosine kinase	rs1407728
56	12	PTPRQ	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q	rs1528288
57	21	CYCSP41, BAGE3	Cytochrome c, somatic pseudogene 41, B melanoma antigen family, member 3	rs1750231
58	17	CCL1, C17ORF102	Chemokine (C-C motif) ligand 1, Chromosome 17 open reading frame 102	rs190038
59	10	GLRX3, TCERG1L	Glutaredoxin 3, Transcription elongation regulator 1-like	rs2281843
60	2	LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2	rs2544390
61	4	ANK2	Ankyrin 2, neuronal	rs362468
62	16	RBFOX1	RNA binding protein, fox-1 homolog	rs4142923
63	9	C9ORF85	Chromosome 9 open reading frame 85	rs4745138
64	5	FYB, C9	FYN binding protein, complement component 9	rs835189
65	20	ADRA1D	Adrenoceptor alpha 1D	rs835882
66	18	ARIH2P1, DSC3	Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 2 pseudogene 1, Desmocollin 3	rs958727

Los SNP's con mayor fuerza de asociación para niveles de ácido úrico se encontraron ubicados en el gen *SLC2A9*. Este gen tiene como función facilitar el transporte de glucosa así como a contribuir a la homeostasis de la misma. De los seis SNP's localizados en este gen, el rs12498742 reportó el menor valor de p (1.0×10^{-700}) en el GWAS de población europea, (66) seguido del rs734553 ($p= 5.2 \times 10^{-201}$) y el rs16890979 ($p= 3.5 \times 10^{-189}$). (67) Así mismo, el gen *ABCG2* cuya proteína tiene como función el transporte molecular a través de las membranas intra y extracelulares y que además presenta una expresión significativa en la placenta (sugiriendo un papel potencial en éste tejido), reportó el SNP rs2231142 con mayor fuerza de asociación con un valor $p=1.0 \times$

10^{-134} . Finalmente, el rs1165151 localizado en el gen *SLC17A1* reportó un valor p de 7.0×10^{-70} como el marcador con mayor significancia en dicho gen.

De los 66 SNP's reportados en la literatura, 29 no fueron medidos directamente en GenPE y tampoco se disponía de una SNP proxy en la plataforma de Affymetrix 6. Adicionalmente, se identificaron 8 SNP's con más de un SNP proxy. Un total de 57 SNP's potencialmente seleccionables para el score se describen en la Tabla 17.

Tabla 17. SNP's y proxies identificados en plataforma Affymetrix 6.0

	SNP de la literatura	Proxy	Distancia	R ²	Mayor	Menor	FAM
1	rs10480300	rs10480299	187	1.000	T	C	0.300
2	rs10503564	rs9325776	11222	1.000	A	G	0.008
3	rs10821905	rs10994720	33992	0.894	G	A	0.192
4	rs1106766	rs1106766	0	1.000	C	T	0.258
5	rs1106766	rs4760278	38303	0.836	C	A	0.275
6	rs1106766	rs4760254	43064	0.836	G	C	0.275
7	rs1165205	rs1165205	0	1.000	A	T	0.500
8	rs1165205	rs1408273	29596	0.869	G	A	0.500
9	rs1165205	rs6905614	30057	0.869	A	C	0.500
10	rs11722228	rs11722228	0	1.000	C	T	0.350
11	rs12498742	rs12498742	0	1.000	A	G	0.225
12	rs1471633	rs10910845	619	1.000	A	C	0.483
13	rs164009	rs164009	0	1.000	A	G	0.383
14	rs16890979	rs874432	1561	0.956	T	A	0.250
15	rs16890979	rs6855911	13743	0.876	A	G	0.267
16	rs17786744	rs819196	34285	1.000	A	T	0.492
17	rs2078267	rs2078267	0	1.000	T	C	0.433
18	rs2079742	rs2079742	0	1.000	T	C	0.158
19	rs2231142	rs1481012	13241	0.920	A	G	0.108
20	rs2281843	rs16910144	31358	1.000	G	A	0.017
21	rs2307394	rs13027200	6775	1.000	A	G	0.342
22	rs2307394	rs2890915	73115	1.000	C	T	0.342
23	rs2307394	rs1014064	104274	1.000	A	G	0.342
24	rs2307394	rs13008838	38397	0.964	A	G	0.350
25	rs2307394	rs12053401	40240	0.964	A	T	0.350
26	rs2307394	rs13019386	161119	0.964	C	G	0.350
27	rs2307394	rs16855486	171112	0.964	T	A	0.350

28	rs2307394	rs1364660	178279	0.964	C	T	0.350
29	rs2544390	rs2673172	46	1.000	G	T	0.383
30	rs2941484	rs2941481	1400	0.818	G	A	0.492
31	rs2941484	rs2941477	2098	0.818	G	A	0.492
32	rs4745138	rs4745138	0	1.000	A	G	0.008
33	rs4970988	rs4970988	0	1.000	G	A	0.350
34	rs505802	rs10897518	3633	1.000	T	C	0.258
35	rs642803	rs557675	6099	1.000	T	G	0.458
36	rs6449213	rs6449213	0	1.000	T	C	0.217
37	rs653178	rs653178	0	1.000	T	C	0.417
38	rs6598541	rs1007212	12783	0.963	A	G	0.333
39	rs6598541	rs2137683	18503	0.963	G	C	0.333
40	rs6598541	rs6598542	21921	0.963	A	G	0.333
41	rs6598541	rs4966024	24435	0.963	A	G	0.333
42	rs675209	rs1285875	13843	0.813	C	G	0.208
43	rs6770152	rs6770152	0	1.000	T	G	0.450
44	rs7188445	rs7188445	0	1.000	G	A	0.392
45	rs7193778	rs7193778	0	1.000	T	C	0.083
46	rs7224610	rs7224610	0	1.000	A	C	0.400
47	rs729761	rs729761	0	1.000	G	T	0.258
48	rs742132	rs742132	0	1.000	A	G	0.358
49	rs7442295	rs7442295	0	1.000	A	G	0.217
50	rs780094	rs780094	0	1.000	C	T	0.400
51	rs7953704	rs1047796	2227	1.000	C	T	0.450
52	rs7953704	rs1047813	2524	1.000	T	A	0.450
53	rs7953704	rs6489244	12451	1.000	T	C	0.450
54	rs7953704	rs10744335	13845	1.000	T	C	0.450
55	rs7976059	rs12367434	3357	0.895	C	T	0.333
56	rs877282	rs11253362	553	1.000	C	A	0.183
57	rs877282	rs11253369	2078	1.000	G	C	0.183

R^2 representa el DL con el SNP de referencia. Un proxy ideal debe tener un $R^2 > 0.8$. FAM: Frecuencia del alelo menor reportada en la literatura.

De estos SNP's, se seleccionó uno por región de acuerdo a los criterios mencionados previamente, como se observa en la Tabla 18.

Tabla 18. SNP's y proxies preseleccionados

	SNP de la literatura	Proxy	p^*
1	rs10480300	rs10480299	4.1×10^{-9}
2	rs10503564	rs9325776	3.6×10^{-19}
3	rs10821905	rs10994720	7.4×10^{-17}
4	rs1106766	rs4760278	2.2×10^{-25}

5	rs1165205	rs6905614	1.6×10^{-13}
6	rs12498742	rs12498742	$<1 \times 10^{-700}$
7	rs1471633	rs10910845	1.2×10^{-29}
8	rs164009	rs164009	1.6×10^{-7}
9	rs16890979	rs874432	3.55×10^{-189}
10	rs17786744	rs819196	1.4×10^{-8}
11	rs2078267	rs2078267	9.4×10^{-38}
12	rs2079742	rs2079742	1.2×10^{-8}
13	rs2231142	rs1481012	1.0×10^{-134}
14	rs2281843	rs16910144	4.8×10^{-12}
15	rs2307394	rs13027200	2.2×10^{-8}
16	rs2544390	rs2673172	4.0×10^{-8}
17	rs2941484	rs2941481	4.4×10^{-17}
18	rs4745138	rs4745138	1.5×10^{-8}
19	rs4970988	rs4970988	1.0×10^{-7}
20	rs505802	rs10897518	2.04×10^{-9}
21	rs642803	rs557675	2.9×10^{-13}
22	rs653178	rs653178	7.2×10^{-12}
23	rs6598541	rs1007212	4.8×10^{-15}
24	rs675209	rs1285875	1.3×10^{-23}
25	rs6770152	rs6770152	2.6×10^{-16}
26	rs7188445	rs7188445	1.6×10^{-9}
27	rs7193778	rs7193778	8.2×10^{-10}
28	rs7224610	rs7224610	5.4×10^{-17}
29	rs729761	rs729761	8.0×10^{-16}
30	rs742132	rs742132	8.5×10^{-9}
31	rs780094	rs780094	1.40×10^{-9}
32	rs7953704	rs1047796	2.6×10^{-8}
33	rs7976059	rs12367434	1.9×10^{-9}
34	rs877282	rs11253362	4.56×10^{-8}

*Valor p reportado en la literatura para el SNP de referencia

▪ *Score genético*

De los SNP's preseleccionados y posterior a la evaluación de desequilibrio de ligamiento, se obtuvieron 20 SNP's independientes, los cuales fueron incluidos en el score final (Tabla 19).

Tabla 19. Score genético final

	Cromosoma	SNP	HWE	FA	FAM	Efecto externo	FAM Genpe	Efecto GenPE	IC95%
1	15	rs1007212	0.180532	0.36	G=0.373	0.043	0.4376	-0.040	-0.108; 0.027
2	12	rs1047796	0.611276	0.47	C=0.493	-0.029	0.455	0.041	-0.027; 0.109
3	7	rs10480299	0.376318	0.28	C=0.198	0.035	0.1766	-0.108	-0.194; 0.021
4	1	rs10910845	0.027531	0.46	C=0.339	0.059	0.4032	-0.112	-0.180; 0.044
5	10	rs10994720	0.098435	0.18	A=0.180	0.057	0.1526	0.018	-0.075; 0.112
6	4	rs12498742	0.695881	0.77	T=0.316	0.373	0.4383	0.224	0.156; 0.292
7	6	rs1285875	0.841993	0.27	C=0.494	0.061	0.412	-0.023	-0.092; 0.045
8	4	rs1481012	0.89771	0.11	G=0.137	-0.076	0.1857	-0.103	-0.192; 0.015
9	11	rs2078267	0.603581	0.51	T=0.255	-0.073	0.218	0.012	-0.071; 0.095
10	2	rs2673172	0.185025	n.r.	T=0.467	-0.082	0.3764	0.082	0.012; 0.152
11	8	rs2941481	0.178689	0.44	G=0.490	0.044	0.4262	0.084	0.016; 0.152
12	12	rs4760278	0.034312	0.24	A=0.137	-0.09	0.263	-0.064	-0.141; 0.011
13	1	rs4970988	0.041702	0.36	A=0.345	-0.028	0.4079	-0.044	-0.112; 0.023
14	12	rs653178	0.056408	0.51	C=0.219	-0.035	0.2162	-0.119	-0.202; 0.037
15	3	rs6770152	0.901289	0.58	G=0.422	-0.044	0.3699	0.003	-0.067; 0.074
16	6	rs6905614	0.553111	0.47	C=0.320	0.060	0.3516	0.023	-0.047; 0.094
17	16	rs7193778	0.052219	0.86	C=0.090	-0.046	0.1104	-0.041	-0.150; 0.067
18	17	rs7224610	0.046256	0.58	C=0.259	-0.042	0.2799	-0.146	-0.221; 0.071
19	6	rs729761	0.122625	0.3	T=0.176	-0.047	0.1475	0.061	-0.033; 0.156
20	8	rs9325776	1	n.r.	G=0.101	-0.039	0.1542	0.032	-0.062; 0.127

HWE: Equilibrio de Hardy Weinberg (valor de p), FA: Frecuencia del alelo del efecto, FAM: Frecuencia del Alelo Menor, n.r.: No reportado. Efecto interno y externo corresponde al coeficiente β reportado en la literatura (Externo) y el estimado a través de regresión lineal simple (interno).

En relación a la distribución de los genotipos incluidos en el score de acuerdo a la raza, se reportó mayor frecuencia de homocigotos para el alelo mutado para el rs7193778 en las afroamericanas mientras que en las mestizas lo fueron los rs10994720 y rs729761 y el rs9325776 en las caucásicas (Tabla 20).

Tabla 20. Distribución de genotipos por etnicidad

SNP	Mestiza n= 1.999	Caucásica n= 444	Afro caribe n= 234	Indígenas n= 14
rs1007212				
TT	392 (19.9%)	66 (15.0%)	54 (23.5%)	4 (28.6%)
TC	934 (47.6%)	221 (50.3%)	102 (44.3%)	8 (57.1%)
CC	637 (32.4%)	152 (34.6%)	74 (32.2%)	2 (14.3%)
rs1047796				
CC	389 (19.8%)	90 (20.4%)	64 (27.9%)	2 (14.3%)
CT	967 (49.2%)	209 (47.5%)	113 (49.3%)	5 (35.7%)
TT	608 (30.9%)	141 (32.0%)	52 (22.7%)	7 (50.0%)

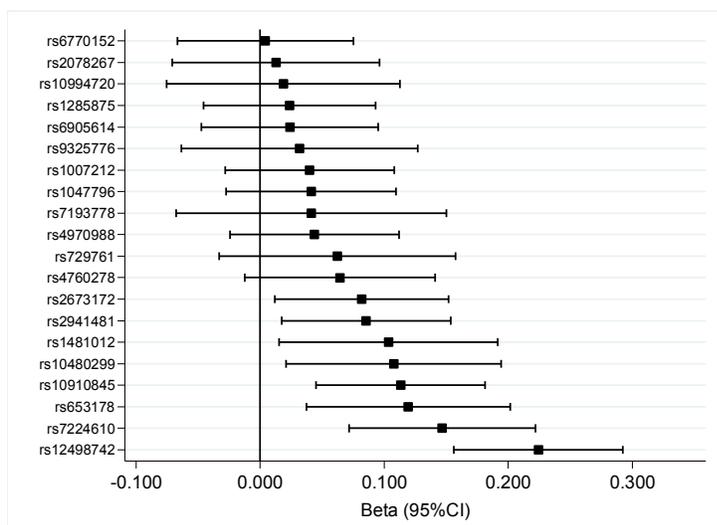
rs10480299				
TT	70 (3.6%)	16 (3.6%)	16 (6.9%)	-
TC	595 (30.7%)	131 (29.7%)	69 (29.9%)	5 (35.7%)
CC	1.301 (66.1%)	293 (66.5%)	146 (63.2%)	9 (64.3%)
rs10910845				
CC	358 (18.2%)	84 (19.1%)	27 (11.7%)	-
CA	894 (45.4%)	221 (50.2%)	100 (43.3%)	10 (71.4%)
AA	714 (36.3%)	135 (30.7%)	104 (45.0%)	4 (28.6%)
rs10994720				
GG	47 (2.4%)	10 (2.3%)	15 (6.5%)	1 (7.1%)
GA	474 (24.2%)	107 (24.5%)	76 (33.2%)	2 (14.3%)
AA	1.432 (73.3%)	319 (73.1%)	138 (60.7%)	11 (78.6%)
rs12498742				
AA	381 (19.4%)	84 (19.1%)	69 (29.8%)	5 (35.7%)
AG	986 (50.2%)	199 (45.2%)	110 (47.6%)	7 (50.0%)
GG	598 (30.4%)	157 (35.7%)	52 (22.5%)	2 (14.3%)
rs1285875				
CC	338 (17.2%)	61 (13.9%)	50 (21.7%)	3 (21.4%)
CG	944 (48.0%)	210 (47.7%)	115 (50.0%)	9 (64.3%)
GG	684 (34.8%)	169 (38.4%)	65 (28.3%)	2 (14.3%)
rs1481012				
AA	75 (3.8%)	12 (2.7%)	4 (1.7%)	1 (7.1%)
AG	622 (31.7%)	115 (26.1%)	53 (23.0%)	4 (28.6%)
GG	1.267 (64.5%)	313 (71.1%)	174 (75.3%)	9 (64.3%)
rs2078267				
GG	87 (4.6%)	32 (7.5%)	4 (1.8%)	1 (8.3%)
GA	643 (33.7%)	166 (38.7%)	55 (24.2%)	4 (33.3%)
AA	1.174 (61.7%)	231 (53.9%)	168 (74.0%)	7 (58.3%)
rs2673172				
GG	270 (13.7%)	48 (10.9%)	63 (27.4%)	2 (14.3%)
GT	918 (46.8%)	171 (38.9%)	111 (48.3%)	4 (28.6%)
TT	773 (39.4%)	220 (50.1%)	56 (24.3%)	8 (57.1%)
rs2941481				
GG	349 (17.8%)	71 (16.1%)	80 (34.6%)	1 (7.1%)
GA	932 (47.5%)	207 (47.0%)	116 (50.2%)	7 (50.0%)
AA	682 (34.7%)	162 (36.8%)	35 (15.1%)	6 (42.9%)
rs4760278				
CC	159 (8.1%)	33 (7.8%)	6 (2.6%)	1 (7.1%)
CA	747 (38.0%)	168 (38.5%)	52 (22.6%)	8 (57.1%)
AA	1.061 (54.0%)	235 (53.9%)	172 (74.8%)	5 (35.7%)
rs4970988				
GG	350 (17.8%)	102 (23.2%)	16 (6.9%)	6 (42.9%)
GA	915 (46.6%)	229 (52.2%)	83 (35.9%)	5 (35.7%)
AA	700 (35.6%)	108 (24.6%)	132 (57.1%)	3 (21.4%)
rs653178				
GG	95 (4.8%)	30 (6.8%)	8 (3.5%)	-
GA	638 (35.2%)	158 (35.9%)	49 (21.3%)	6 (42.9%)
AA	1.229 (62.6%)	252 (57.3%)	173 (75.2%)	8 (57.1%)
rs6770152				
TT	271 (13.8%)	62 (14.1%)	28 (12.1%)	3 (21.4%)
TG	917 (46.6%)	217 (49.3%)	100 (43.3%)	8 (57.1%)
GG	778 (39.5%)	161 (36.6%)	103 (44.6%)	3 (21.4%)
rs6905614				
AA	239 (12.2%)	72 (16.4%)	22 (9.5%)	3 (21.4%)
AC	898 (45.7%)	197 (44.7%)	98 (42.4%)	3 (21.4%)
CC	829 (42.2%)	171 (38.9%)	111 (48.0%)	8 (57.1%)
rs7193778				
TT	28 (1.4%)	10 (2.8%)	1 (0.4%)	1 (7.1%)
TC	355 (18.1%)	104 (23.6%)	24 (10.4%)	4 (28.6%)
CC	1.583 (80.5%)	326 (74.1%)	206 (89.2%)	9 (64.3%)
rs7224610				

AA	147 (7.5%)	60 (13.7%)	8 (3.5%)	1 (7.1%)
AC	751 (38.2%)	195 (44.4%)	65 (28.1%)	8 (57.1%)
CC	1.067 (54.3%)	184 (41.9%)	158 (68.4%)	5 (35.7%)
rs729761				
GG	49 (2.5%)	10 (2.3%)	8 (3.5%)	1 (7.1%)
GT	481 (24.5%)	115 (26.1%)	50 (21.6%)	-
TT	1.435 (73.0%)	315 (71.6%)	173 (74.9%)	13 (92.9%)
rs9325776				
AA	53 (2.7%)	4 (0.9%)	4 (1.7%)	1 (7.1%)
AG	507 (25.8%)	107 (24.3%)	70 (30.4%)	7 (50.0%)
GG	1.402 (71.5%)	329 (74.7%)	156 (67.8%)	6 (42.9%)

Respecto al sitio de reclutamiento, la frecuencia del genotipo homocigoto para alelo mutado fue mayor al 60% en todos los departamentos en el caso de los rs10480299, rs1481012 y rs729761. Cartagena y Bucaramanga presentaron la mayor frecuencia de homocigotos del alelo mutado para el rs7193778 (85.5% y 74.1%, respectivamente), mientras que en Medellín fue para el rs7193778 (80.3%), en Cali el rs729761 (82.0%), en Bogotá el rs9325776 (73.6%), en Tunja el rs10994720 (90.3%), en Cúcuta los rs729761 y rs2673172 (79.2%) y en Popayán el rs10994720 (100%).

La asociación entre los SNP's individuales incluidos en el score y los niveles de ácido úrico se presentan en la figura 5-9. El SNP con mayor efecto fue el rs12498742, indicando que por la adición de un alelo de riesgo, se produce un incremento de 0.224 mg/dl (Error estándar 0.035, IC95% 0.156 - 0.292, $R^2 = 0.015$, $p < 0.001$) en los niveles de ácido úrico.

Figura 5-9. Asociación entre los SNP's individuales y los niveles de ácido úrico



Por otra parte, el rs1047796 presentó una asociación significativa con la edad (-0.267, IC95% -0.427; -0.107, Error estándar= 0.081, $p=0.001$) mientras que los rs2078267 (-0.651, IC95% -1.039; -0.264, $p=0.001$) y el rs2941481 (0.537, IC95% 0.151; 0.923, $p=0.006$) lo hicieron con el consumo de cigarrillo en el embarazo actual (Figuras 5-10 y 5-11).

Figura 5-10. Asociación entre los SNP's individuales y edad

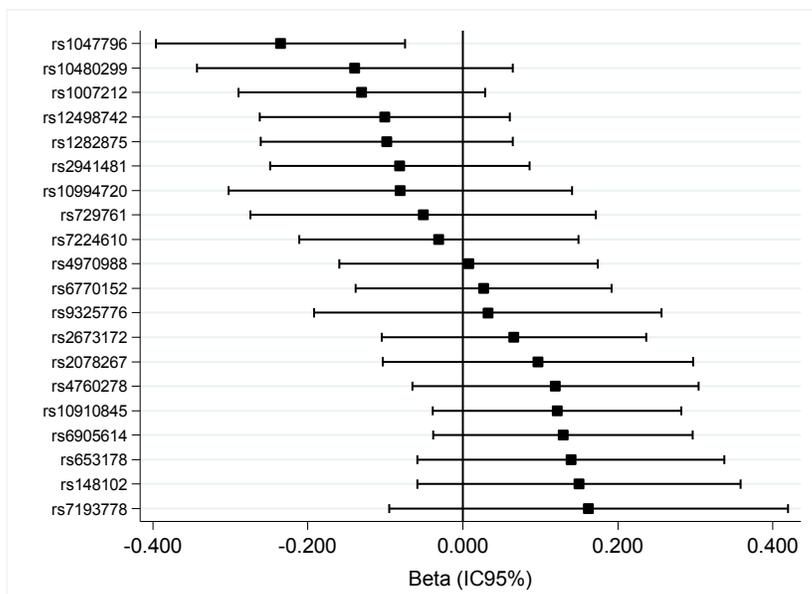
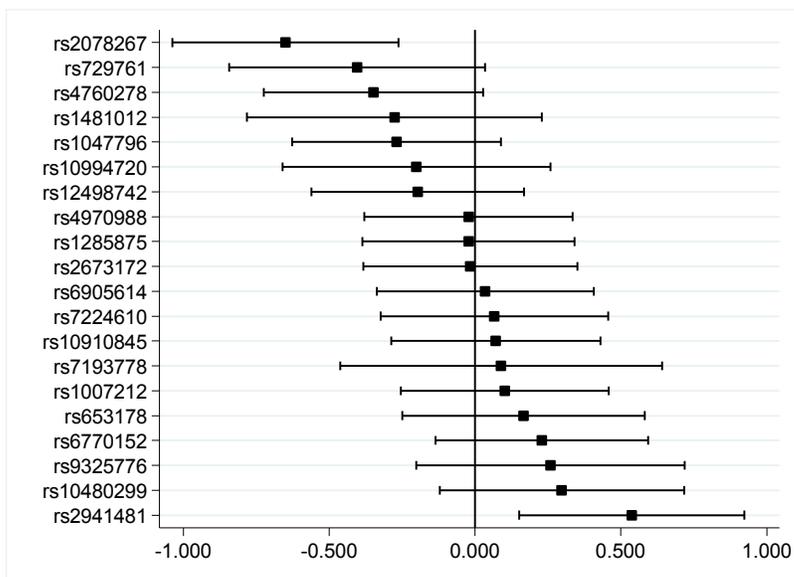


Figura 5-11. Asociación entre los SNP's individuales y tabaquismo



Z (Score) está asociado con la exposición (Niveles de ácido úrico)

El score genético presentó una asociación con los niveles de ácido úrico, tanto ponderado por pesos externos con y sin ajuste por componentes principales ($\beta= 0.255$, ES 0.075, IC95% 0.107 - 0.403, $R^2=0.033$, $p= <0.001$ y $\beta= 0.274$, ES 0.076, IC95% 0.124 - 0.433, $R^2=0.004$, $p= <0.001$, respectivamente) así como para el score ponderado por pesos internos ($\beta= 0.650$, ES 0.096, IC95% 0.461 – 0.839, $R^2=0.045$, $p= <0.001$ y $\beta= 0.858$, ES 0.087, IC95% 0.686 – 1.031, $R^2=0.034$, $p= <0.001$, respectivamente). El score sin ponderar reportó un valor p de 0.09, el cual al hacer el análisis ajustado aumentó ($p= 0.324$). En esta misma vía, el score sin ponderar no presentó una relación clara entre el incremento en los quintiles y los beta de los niveles de ácido úrico ($p= 0.021$, $R^2= 0.0043$, Figura 5-12), sin embargo se observó una relación lineal positiva entre el score ponderado por el peso externo ($p= <0.001$, $R^2= 0.035$, Figura 5-13) e interno ($p= <0.001$, $R^2= 0.047$, Figura 5-14) con los niveles del marcador en estudio.

Figura 5-12. Asociación entre el score genético sin ponderar y los niveles de ácido úrico

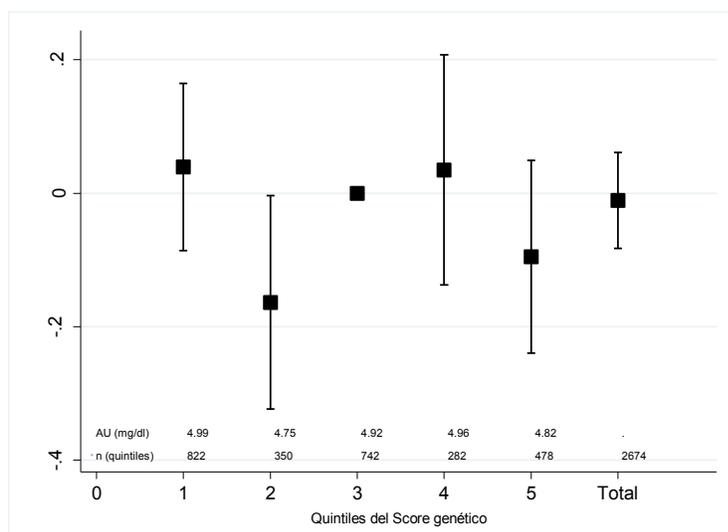


Figura 5-13. Asociación entre el score genético ponderado con pesos externos y los niveles de ácido úrico

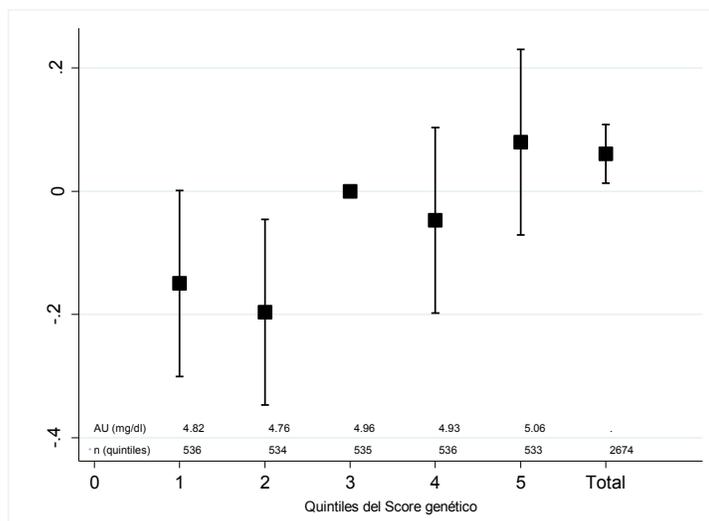
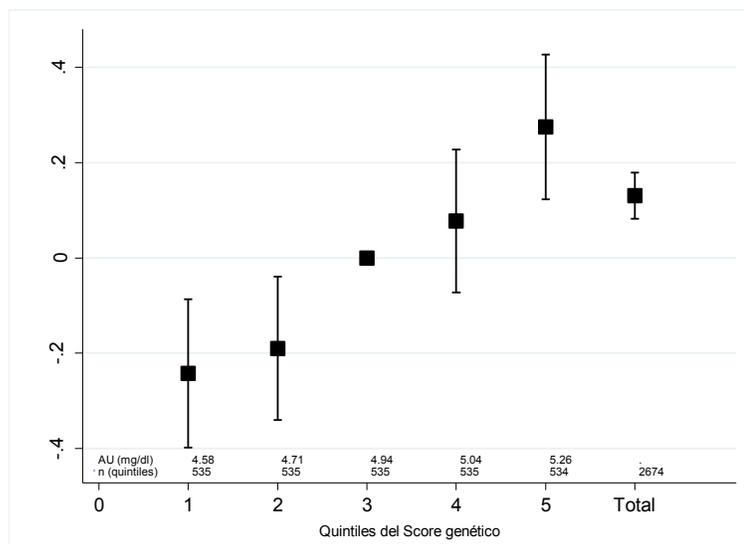


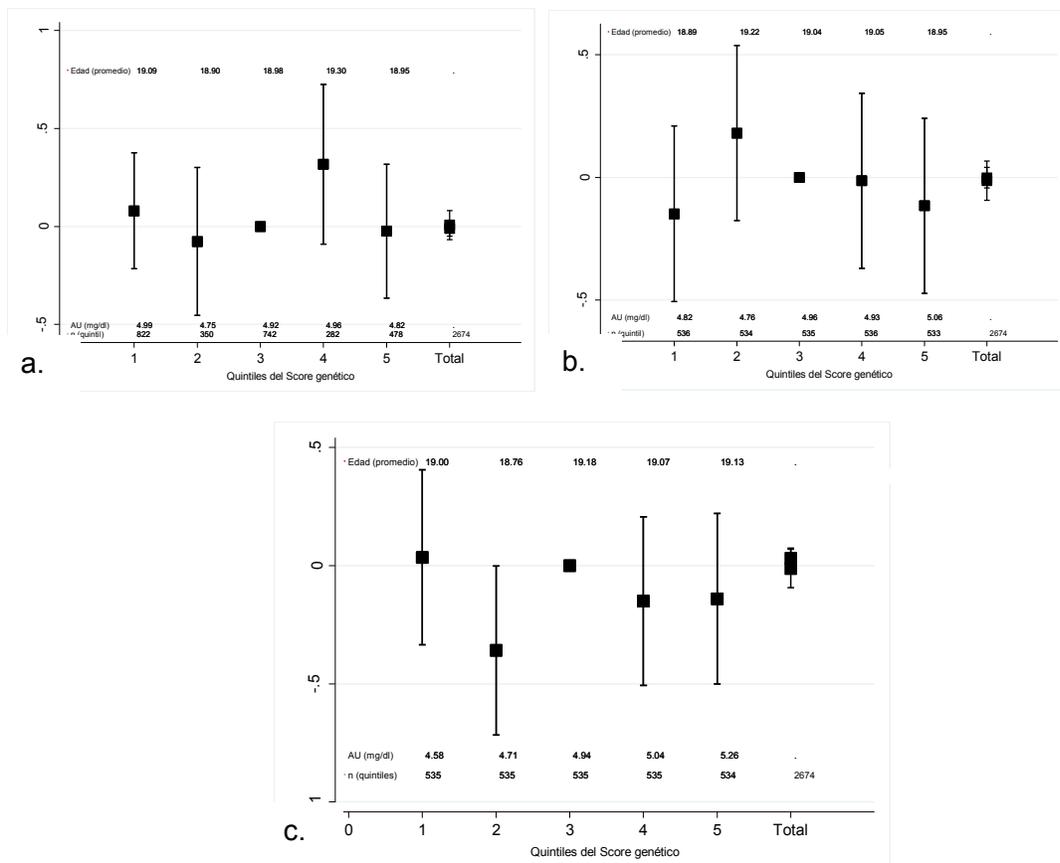
Figura 5-14. Asociación entre el score genético ponderado con pesos internos y los niveles de ácido úrico



Z (Score) es independiente de variables de confusión (U) en la asociación de interés

La edad no presentó asociación con el score sin ponderar ($p=0.805$), ponderado por pesos externos ($p=0.753$) ni internos ($p=0.801$), Figura 5-15.

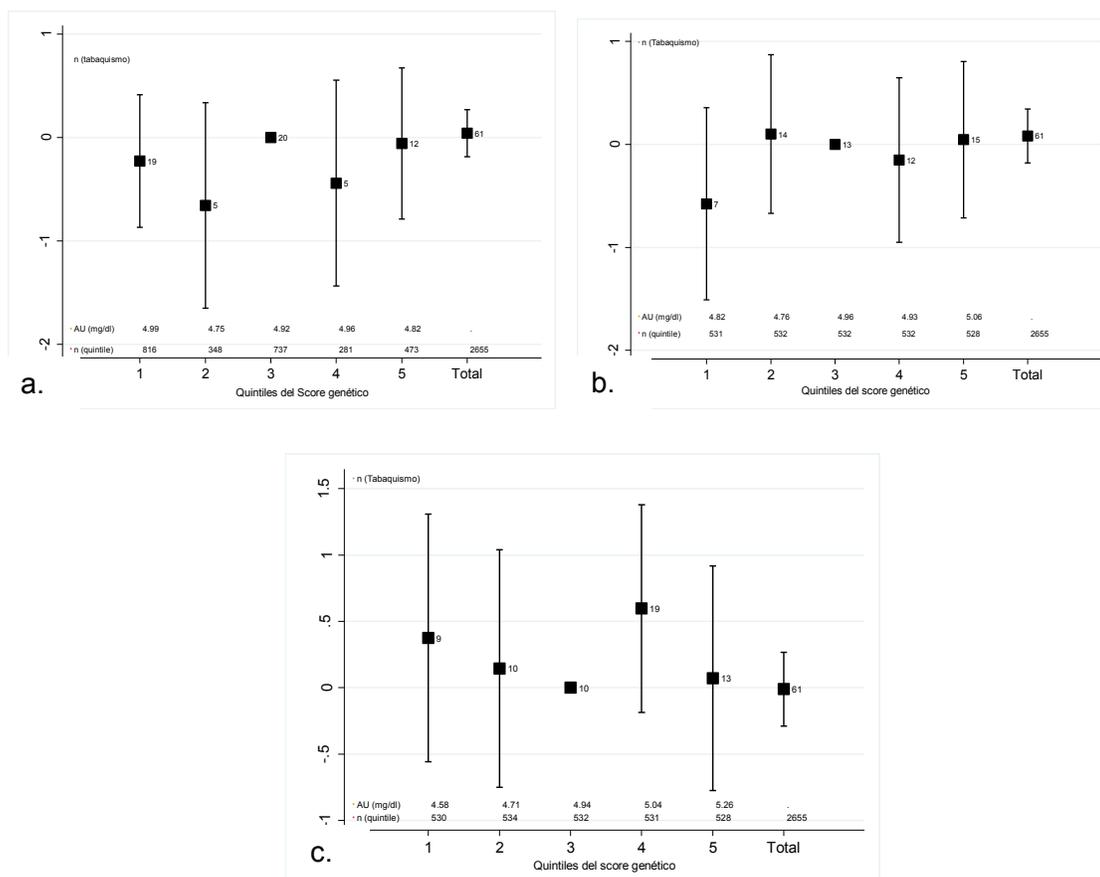
Figura 5-15. Asociación entre el score y la edad



a. Asociación entre el score genético sin ponderar y la edad. b. Asociación entre el score genético ponderado con pesos externos y la edad. c. Asociación entre el score genético ponderado con pesos internos y la edad

El consumo de cigarrillo en el embarazo actual tampoco se asoció con el score sin ponderar (log odds= 0.026, IC95% -0.061, 0.200, p=0.768), ponderado por pesos externos (log odds= 0.119, IC95% -0.148, 0.300, p=0.196), ni internos (log odds= 0.145, IC95% -0.036, 0.327, p=0.117), Figura 5-16.

Figura 5-16. Asociación entre el score y consumo de cigarrillo

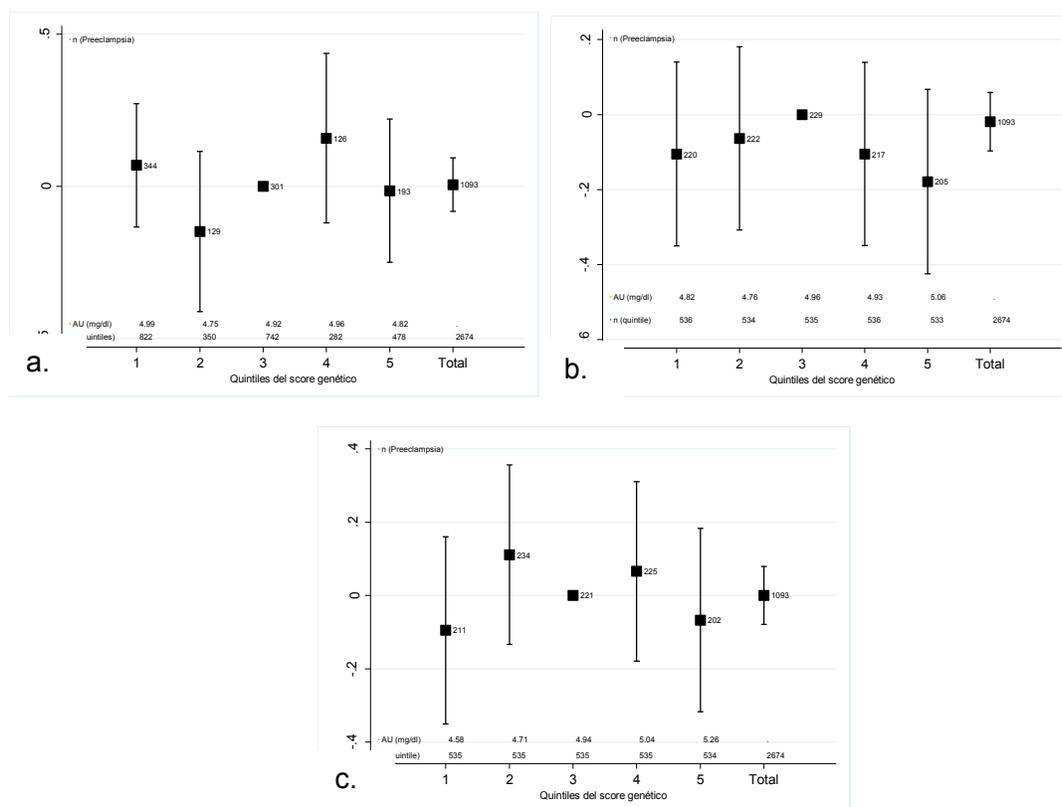


a. Asociación entre el score genético sin ponderar y el consumo de cigarrillo. b. Asociación entre el score genético ponderado con pesos externos y el consumo de cigarrillo. c. Asociación entre el score genético ponderado con pesos internos y el consumo de cigarrillo

Z (SNP) no afecta el desenlace (Preeclampsia), excepto por la vía de la exposición

Finalmente, el score genético sin ponderar (log odds= 0.002, IC95% -0.050, 0.056, p=0.913), ponderado por pesos externos (log odds= -0.025, IC95% -0.080, 0.028, p=0.353) o internos (log odds= -0.020, IC95% -0.074, 0.034, p=0.466), no se asociaron con el desenlace de interés, Figura 5-17.

Figura 5-17. Asociación entre el score y preeclampsia



a. Asociación entre el score genético sin ponderar y la presencia de preeclampsia. b. Asociación entre el score genético ponderado con pesos externos y la presencia de preeclampsia. c. Asociación entre el score genético ponderado con pesos internos y la presencia de preeclampsia

Finalmente, el análisis de Randomización Mendeliana a través del uso de variables instrumentales se reporta en la Tabla 21.

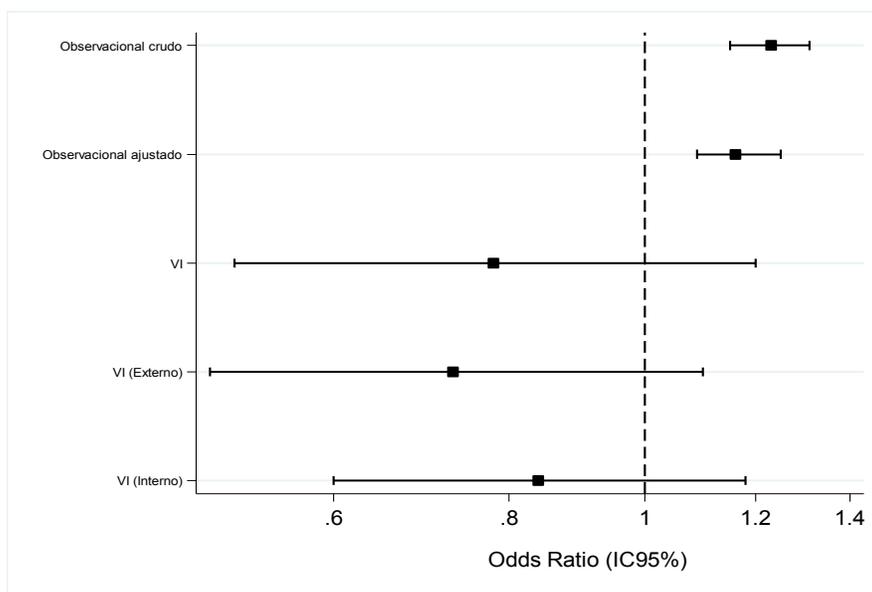
No se observó una asociación causal entre el odds de ser un caso por el incremento de 1 mg/dl en los niveles de ácido úrico, a diferencia de lo observado en el análisis observacional (Figura 5-18).

Tabla 21. Estimadores del análisis de Randomización Mendeliana

Variable instrumental	OR (IC95%)*	Error estándar	R ²
Estimador causal con score sin ponderar	0.78 (0.51, 1.20)	0.17	0.0003
Estimador causal con score ponderado por peso externo	0.73 (0.49, 1.10)	0.15	0.0006
Estimador causal con score ponderado por peso interno	0.84 (0.60, 1.18)	0.14	0.0003

*Estimación causal obtenida a través del método de variables instrumentales a partir de un modelo de regresión logística utilizando los valores predichos de ácido úrico en un modelo previo de regresión lineal múltiple ajustada por componentes principales.

Figura 5-18. OR e intervalos de confianza para preeclampsia obtenidos en los diferentes análisis observacionales y de variables instrumentales



*OR indica el *odds* de ser un caso por el incremento en 1mg/dl en los niveles de ácido úrico.

6. Conclusiones

A partir del análisis observacional se encontró una asociación de riesgo entre los niveles elevados de ácido úrico y la presencia de preeclampsia en las pacientes del estudio GenPE. Estos hallazgos han sido reportados previamente en otros estudios observacionales, (31, 33) incluyendo aquellos con seguimiento desde el inicio de la gestación. (42, 111) No obstante, si bien la asociación permaneció significativa al incluir todas las posibles variables de confusión, se observó una atenuación en la magnitud de la misma con los estimadores ajustados. Por otra parte, establecer el tipo de asociación entre un factor de riesgo modificable y un desenlace puede ser difícil a partir de un estudio de casos y controles dado que los niveles del metabolito fueron medidos después del inicio de la enfermedad pudiendo llevar a un escenario de causalidad reversa. Dichas situaciones son las principales motivaciones para complementar el estudio de asociación a través del método de Randomización mendeliana con marcadores genéticos como variables instrumentales. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de éste tipo de análisis no permitieron establecer un efecto causal del ácido úrico en el desarrollo de la preeclampsia en esta población colombiana.

La confiabilidad de los resultados de análisis de Randomización Mendeliana depende de la validez de las variantes seleccionadas como variables instrumentales y el poder necesario para detectar efectos causales clínicamente relevantes. En este estudio se realizó una búsqueda minuciosa de variantes genéticas asociadas a los niveles de ácido úrico a través de lo reportado en diferentes estudios ampliados del genoma con la posterior construcción de un score genético de SNP's independientes para resumir el efecto de todas las variantes en una sola variable instrumental. Dicho score incluyó la variante con mayor efecto reportado en la literatura, dando soporte a la plausibilidad biológica entre el rs12498742 y los niveles de ácido úrico, la cual había sido medida directamente en la población de GenPE. Adicionalmente, las asunciones de variable instrumental fueron evaluadas para el score con los diferentes tipos de ponderación, lo cual se resalta la validez de dicha variable. Por otra parte, en el escenario de un efecto causal modesto y baja correlación entre las variantes genéticas y los niveles del marcador, se puede requerir de varios miles de pacientes a estudiar para identificar un

efecto. Es por esto que antes de concluir una ausencia de efecto causal del ácido úrico en la preeclampsia, deberían replicarse los resultados en una muestra mayor de pacientes para ser capaz de identificar estimadores causales más pequeños ($OR < 2.2$).

A la fecha no se cuenta con estudios publicados de Randomización Mendeliana para ácido úrico ni otros marcadores en sangre en el contexto de la preeclampsia. Sin embargo, el papel del ácido úrico sí ha sido evaluado en otras enfermedades cardiovasculares reportando resultados contradictorios entre los análisis observacionales y aquellos realizados a través de Randomización mendeliana. Un estudio de dos grandes cohortes evaluó el efecto de éste marcador y su asociación con enfermedad isquémica coronaria y los niveles de presión arterial en cerca de 59.000 sujetos. (102) El análisis observacional reportó una elevación de 2.42 mmHg (2.32 – 2.51mmHg) por el incremento en una desviación estándar de ácido úrico y una asociación de riesgo (HR 1.21, IC95% 1.18 – 1.24) para la enfermedad isquémica sin embargo, el estimador causal obtenido a través del análisis con una variable instrumental (*SLC2A9*, rs7442295) no fue significativo para cambios en la presión arterial (0.63mmHg, IC95% -0.04 – 1.29) o enfermedad coronaria (HR 0.93, IC95% 0.79 – 1.09). (102) En esta misma vía, a través de un score genético que incluyó 14 SNP's asociados a ácido úrico (incluyendo *SLC2A9*, rs12498742, *HLF*, rs7224610, *SLC22-A11*, rs2078267, entre otros), tampoco fue posible establecer el efecto causal de éste marcador con diferentes desenlaces cardiovasculares como enfermedad coronaria, diabetes mellitus, accidente cerebrovascular y falla cardíaca, excepto el riesgo de gota (OR 5.84; IC95% 4.56 – 7.49). (112) Así mismo, un meta-análisis de 17 estudios observacionales prospectivos y 166.486 individuos estudió el papel de este metabolito sobre el riesgo de enfermedad coronaria a través de un score genético con 31 SNP's, sin ser posible establecer una asociación de tipo causal (OR 1.05; IC95% 0.92 – 1.20). (113) Sin embargo, otros estudios como el reportado por Kleber et al, estudió la asociación casual entre ácido úrico y desenlaces cardiovasculares utilizando un score genético (8 SNP's) ponderado, encontrando un estimador causal para mortalidad por enfermedades cardiovasculares (HR, 1.77; IC95% 1.12 - 2.81) y muerte súbita (HR, 2.41; IC95% 1.16 - 5.00) por el incremento en una unidad (mg/dl) de ácido úrico. (114)

De acuerdo a lo presentado, el análisis de Randomización mendeliana permite complementar la estimación de las medidas de asociación obtenidas a través del análisis de regresión en los datos observacionales. Futuros estudios con muestras más grandes de gestantes con y sin preeclampsia deben ser desarrollados con el objetivo de confirmar los hallazgos aquí reportados.

Anexo 1: Consentimiento informado Proyecto GenPE



Paciente N°: _____

Consentimiento Informado. Proyecto GenPE

INTRODUCCIÓN

La Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Bucaramanga – UNAB–, en asocio con Universidades e Instituciones de Salud de Colombia y en alianza con Colciencias y Universidades de Reino Unido, investigan desde el año 2000 factores de riesgo genético asociados a Preeclampsia y sus complicaciones. La Preeclampsia es una enfermedad caracterizada por hipertensión arterial durante el embarazo, la cual es muy común en nuestro medio, y causa importante de mortalidad materna y perinatal en el mundo entero.

OBJETIVO-JUSTIFICACIÓN

El objetivo general del proyecto es investigar marcadores genéticos y serológicos asociados con el riesgo de desarrollar Preeclampsia. En el estudio genético se hará un análisis amplio de marcadores genéticos (*Genome-wide scan*), lo cual permitirá en un futuro desarrollar medidas preventivas y tratamientos adecuados, evitando que más mujeres y sus hijos enfermen y mueran a causa de la Preeclampsia o de sus complicaciones.

PARTICIPACIÓN

Si desea participar en el estudio, usted responderá un cuestionario que incluye sus datos de identificación y antecedentes de ciertas enfermedades personales y familiares. Luego se realizarán dos tomas de tensión arterial y se le pedirá que recoja una muestra de orina. Finalmente, se tomará una muestra de sangre por punción en la vena del antebrazo, utilizando material desechable, la cual será prácticamente indolora y sin repercusiones para su salud. Si usted lo autoriza, se tomará una muestra de la sangre del cordón umbilical del bebé, a quien no se le hará ninguna punción. Las muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas en el proyecto y almacenadas en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de la UNAB. Las muestras serán analizadas para conocer los niveles en sangre de determinados marcadores serológicos. Además, se extraerá ADN para realizar análisis de marcadores genéticos asociados a la enfermedad, procedimiento que NO implica manipulación genética.

GARANTÍAS PARA SU PARTICIPACIÓN

Todos sus datos de identificación, resultados y análisis del estudio serán mantenidos en anonimato. La decisión de participar es totalmente voluntaria, sin costo alguno. Usted es libre de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar sin que por ello se generen perjuicios de tipo laboral, social, económico o en la relación que usted

mantiene con su médico. La información generada es estrictamente confidencial y a ella sólo tendrán acceso los investigadores. Los resultados generales del estudio se publicarán y serán presentados en congresos, pero en ningún caso usted será identificada personalmente. Si decide retirarse del estudio, sus muestras serán inmediatamente descartadas.

Es importante aclarar que ninguna persona involucrada en el estudio, incluyéndola a usted, recibirá beneficio económico alguno como pago por su participación. Usted recibirá fiel copia de este documento. Si tiene alguna pregunta, no dude en hacerla; con mucho gusto el personal investigador aclarará sus inquietudes.

BENEFICIOS

Esta investigación pretende conocer porqué se desarrolla la Preeclampsia, y a partir de allí, desarrollar medidas preventivas y nuevos medicamentos que puedan tratar de manera oportuna a la mujer con esta enfermedad, evitando que más mujeres y sus hijos enfermen o mueran a causa de la Preeclampsia o de sus complicaciones. Es importante que usted tenga en cuenta que si decide que su información y muestra de sangre puedan ser utilizadas en estudios futuros, siempre tendrá el derecho de mantener su anonimato y a retirar este consentimiento en cualquier momento que considere conveniente. El interés del grupo de investigación es seguir estudiando la predisposición genética que tienen las personas para presentar enfermedades comunes en nuestra población, pero NUNCA su muestra de DNA será utilizada para procedimientos de manipulación genética.

Contacto:

Si usted tiene alguna duda sobre este estudio o necesita información adicional, por favor contáctenos:

Centro Coordinador Nacional GenPE

GenPE@unab.edu.co

Teléfono: +57-7- 6399156, ext. 505 Dra. Norma Serrano – Dra. Carolina Páez

Bucaramanga - Colombia

Consentimiento:

Con mi firma declaro que los alcances del estudio me han sido explicados, que todas mis preguntas fueron respondidas y que los posibles daños o molestias o posibles beneficios me han sido explicados. Entiendo que tengo el derecho de no participar o de dejar de participar en cualquier momento, sin que por ello sufra alguna consecuencia en la atención médica, y que la información que pueda identificarme no será publicada ni presentada en congresos. Yo, por lo tanto, doy mi autorización para participar en el estudio GenPE.

Nombre de la participante: _____ CC No. _____

Fecha: _____

Firma de la participante _____

Yo, de manera voluntaria autorizo que las muestras de sangre y el ADN extraído sean:
Desechadas una vez el estudio finalice _____

Preservados para posteriores estudios nacionales o internacionales relacionados
 con el actual _____

Nombre del Testigo _____ CC No. _____

Firma del Testigo _____

Consentimiento para la participación del recién nacido

Yo/Nosotros, _____ y _____,
 con CC No. _____ de _____ y
 _____ de _____ respectivamente, como
 padre(s)/representante(s) legal(es), de manera voluntaria doy/damos mi/nuestro
 consentimiento para la toma de una muestra de la sangre del cordón umbilical de
 mi/nuestro hijo(a) para que haga parte del proyecto GenPE.

Declaro que dado que el padre de mi hijo(a) no está disponible, decido dar la
 autorización en nombre de los dos.

Yo/Nosotros doy/damos nuestro consentimiento para que las muestras de sangre del
 cordón umbilical y ADN de mi/nuestro hijo(a) sean:

Desechadas una vez el estudio finalice _____

Preservados para posteriores estudios nacionales o internacionales relacionados con el
 actual _____

Firma de la Madre _____ Firma del Padre _____

Firma del Testigo _____

Nombre de la persona que obtuvo el consentimiento:

Firma _____ / CC No. _____ / _____

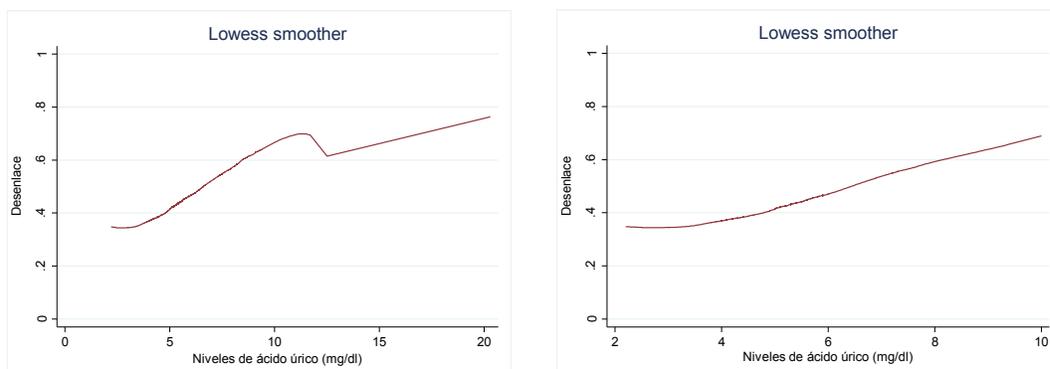
Fecha

PREGUNTAS REALIZADAS POR LOS PARTICIPANTES

Anexo 2: Relación funcional entre el desenlace y la exposición en el modelo de regresión logística

Cuando se incluyen los valores séricos del metabolito con 4DE por encima de la media (14 pacientes), no se observa una relación lineal entre la exposición y el desenlace.

Figura 6-1. Relación funcional entre la presencia de preeclampsia y los niveles de ácido úrico.



A. Relación con presencia de valores extremos. B. Relación sin presencia de valores extremos.

(107)

Posteriormente, se realizó un análisis de asociación mediante regresión logística robusta (por la presencia valores extremos), pero a pesar de esto el marcador no tenía una relación lineal con el desenlace. Por tanto, se realizó un análisis de sensibilidad para comparar los estimadores y errores estándar de las regresiones logísticas con y sin estos valores (Tabla 22).

Tabla 22. Estimados de la regresión logística robusta con y sin valores extremos

Modelo*	OR	IC95%		Coefficientes	IC95%	
Ajustado sin valores extremos	1,16	1,08	1,24	0,15	0,08	0,22
Ajustado con valores extremos	1,15	1,07	1,22	0,14	0,07	0,20

*Ajustado todas las variables de confusión

Sin estas 14 pacientes, los estimadores de asociación obtenidos a través de regresión variaron mínimamente por lo que se decidió excluir estas pacientes del análisis.

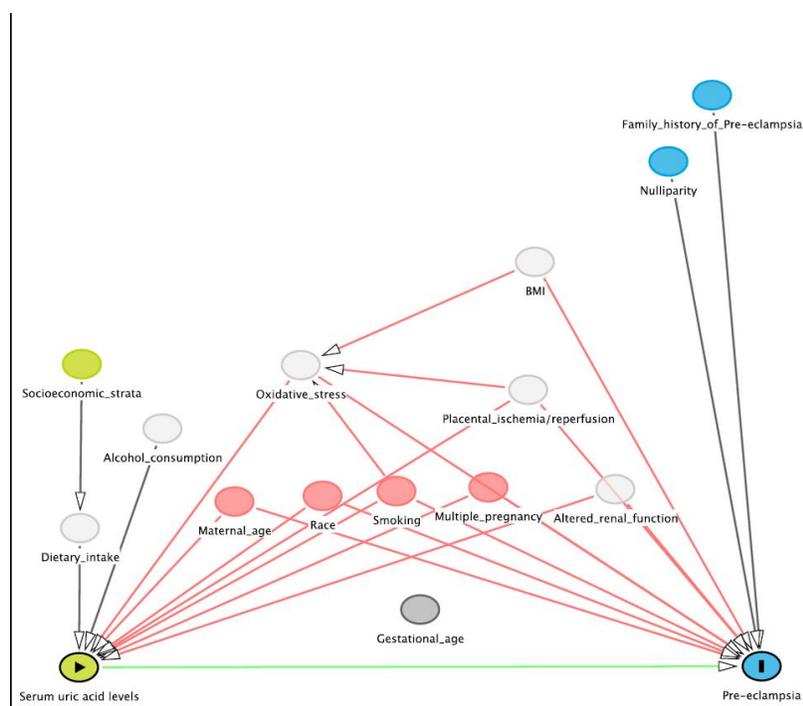
Anexo 3: Construcción del modelo de regresión logística

Para la construcción del modelo se siguieron los pasos planteados por Kleinbaum. (115)

1. Especificación de las variables

A través de la revisión de la literatura, se identificaron las posibles variables de interés relacionadas con los niveles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia. Esta información fue esquematizada mediante un diagrama causal acíclico, con el objetivo de entender las posibles relaciones causales entre dichas variables como se observa en la figura 6-1. El diagrama fue realizado mediante el programa DAGitty. (116)

Figura 6-2. Diagrama causal acíclico.



Relaciones causales entre los niveles de ácido úrico y la presencia de preeclampsia. En gris claro se expone la información que no fue captada o medida en nuestra población. En rosado, se grafican las variables recolectadas que se asocian con la exposición y desenlace de interés. En verde sólo aquellas relacionadas con la exposición y en azul las asociadas al desenlace.

El consumo de proteínas es una de las variables que más se asocia a niveles elevados de ácido úrico. (117) En nuestro medio, el consumo de proteínas está influenciado por el estrato socioeconómico. La edad en las mujeres se ha correlacionado con mayores niveles del marcador (correlación parcial 0.08, $p=0.01$) (117) y mayor riesgo de preeclampsia para aquellas con más de 35 años (9.4% vs 6.4%).(118) La raza, se ha reportado como una variable que predispone a mayores niveles de ácido úrico y gota en ciertos grupos étnicos, evidenciando un papel relacionado con la predisposición genética. (119) Así mismo, en las mujeres afroamericanas se ha reportado mayor incidencia de preeclampsia comparadas con las caucásicas (5.2%; OR 1.41, IC95% 1.25-1.62). (120)

La relación entre las variables expuestas en el diagrama fue tomada en cuenta junto con el análisis bivariado inicial entre casos y controles para identificar las posibles variables de confusión.

2. Evaluación de la interacción

Se estudió el efecto del tiempo (entre la captación y la medición de los niveles del marcador) sobre la asociación entre la preeclampsia y los niveles de ácido úrico con el objetivo de establecer si el efecto del factor de riesgo (niveles) en el desenlace es constante independientemente del tiempo de almacenamiento de las muestras (Tabla 22).

- *Identificación de las variables*

X: Niveles de ácido úrico estandarizados

Z: Tiempo de almacenamiento

Y: Presencia de preeclampsia

Teniendo esto en cuenta, se decidió evaluar la interacción: +/- 5 años de almacenamiento * niveles estandarizados de ácido úrico, mediante el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 z_i + \beta_3 x * z_i$$

Donde:

β_0 = Constante

B1= coeficiente de los niveles de ácido úrico estandarizados

B2= coeficiente del tiempo de almacenamiento

B3= coeficiente de la interacción

Tabla 23. Evaluación de la Interacción

Modelo	Coef	Error std	Log likelihood	z	P>z	IC95%
Sin ajustar	.275	.036	-2181.936	7.61	0.000	0.204 0.346
Más almacenamiento >5 años	.263	.036	-2178.788	7.22	0.000	0.191 0.334
Más interacción	.241	.040	-2178.011	6.00	0.000	0.162 0.320

*Coef: Coeficiente de regresión, std: Estándar

Los coeficientes de regresión y los Log likelihood estimados en el modelo completo (con la interacción) permanecen constantes (Tabla 23), lo cual es confirmado a través del likelihood ratio test para comparar el modelo con y sin la interacción, $p=0.212$.

3. Evaluación de los factores de confusión seguido por la consideración de precisión.

La construcción del modelo de regresión logística se realizó de forma acumulativa y se evaluó la significancia de las variables en cada uno de los modelos a través del likelihood ratio test como se observa en la Tabla 24.

Tabla 24. Construcción del modelo de regresión logística

Ajuste	OR (IC 95%)*	LR**	p
Sin ajustar	1.31 (1.22, 1.41)	-	-
Edad materna	1.30 (1.21, 1.40)	28.62	<0.001
Edad gestacional	1.19 (1.10, 1.30)	862.92	<0.001
Raza	1.20 (1.10, 1.30)	5.46	0.141
Sitio de reclutamiento	1.21 (1.11, 1.32)	44.94	<0.001
Fecha de captación	1.23 (1.12, 1.34)	4.32	0.037
Antecedente materno de preeclampsia	1.21 (1.11, 1.32)	12.49	<0.001
Antecedente de hermana con preeclampsia	1.20 (1.07, 1.34)	3.80	0.050

Tabaquismo	1.23 (1.13, 1.35)	0.84	0.360
Embarazo múltiple	1.23 (1.13, 1.35)	4.06	0.043
ESE bajo	1.21 (1.11, 1.33)	0.01	0.940
Infecciones	1.21 (1.11, 1.33)	5.81	0.015

*Odds Ratio (Intervalo de confianza del 95%), **Likelihood Ratio Test

Teniendo en cuenta el diagrama causal acíclico así como el análisis bivariado de las características sociodemográficas y clínicas de las pacientes, se incluyeron las siguientes variables en el modelo de regresión logística: edad materna, edad gestacional, raza, sitio de reclutamiento, fecha de captación, embarazo múltiple, ESE bajo e infecciones.

Si bien el antecedente materno y en hermana de preeclampsia son variables asociadas estadísticamente con el desenlace en nuestro estudio, tienen mayor probabilidad de presentar sesgo de memoria y no se cuenta con información para poder confirmar o descartar dicho antecedente, por lo que no fueron incluidas dentro del modelo de regresión.

Anexo 4: SNP's reportados en la literatura de acuerdo al origen étnico

Se describen los SNP's asociados a niveles de ácido úrico encontrados en el meta análisis de estudios ampliados del genoma en población general y de origen caucásico y los reportados por el consorcio UCLEB (Tabla 25, 26 y 27). (66)

Tabla 25. SNP's de ácido úrico en población caucásica.

	SNP	Cromosoma	Gen	A1	A2	F A1	Efecto	E.S.	p
1	rs10480300	7	<i>PRKAG2</i>	T	C	0.28	0.035	0.006	4.1×10^{-9}
2	rs10821905	10	<i>A1CF</i>	A	G	0.18	0.057	0.007	7.4×10^{-17}
3	rs11264341	1	<i>TRIM46</i>	T	C	0.43	-0.050	0.006	6.2×10^{-19}
4	rs1165151	6	<i>SLC17A1</i>	T	G	0.47	-0.091	0.005	7.0×10^{-70}
5	rs1171614	10	<i>SLC16A9</i>	T	C	0.22	-0.079	0.007	2.3×10^{-28}
6	rs1178977	7	<i>BAZ1B</i>	A	G	0.81	0.047	0.007	1.2×10^{-12}
7	rs12498742	4	<i>SLC2A9</i>	A	G	0.77	0.373	0.006	1.0×10^{-700}
8	rs1260326	2	<i>GCKR</i>	T	C	0.41	0.074	0.005	1.2×10^{-44}
9	rs1394125	15	<i>UBE2Q2</i>	A	G	0.34	0.043	0.006	2.5×10^{-13}
10	rs1471633	1	<i>PDZK1</i>	A	C	0.46	0.059	0.005	1.2×10^{-29}
11	rs164009	17	<i>QRICH2</i>	A	G	0.61	0.028	0.005	1.6×10^{-7}
12	rs17050272	2	<i>INHBB</i>	A	G	0.43	0.035	0.006	1.6×10^{-10}
13	rs17632159	5	<i>TMEM171</i>	C	G	0.31	-0.039	0.006	3.5×10^{-11}
14	rs17786744	8	<i>STC1</i>	A	G	0.58	-0.029	0.005	1.4×10^{-8}
15	rs2078267	11	<i>SLC22A11</i>	T	C	0.23	-0.073	0.006	9.4×10^{-38}
16	rs2079742	17	<i>BCAS3</i>	T	C	0.85	0.043	0.008	1.2×10^{-8}
17	rs2231142	4	<i>ABCG2</i>	T	G	0.11	0.217	0.009	1.0×10^{-134}
18	rs2307394	2	<i>ORC4L</i>	T	C	0.68	-0.029	0.005	2.2×10^{-8}
19	rs2941484	8	<i>HNF4G</i>	T	C	0.48	0.044	0.005	4.4×10^{-17}
20	rs3741414	12	<i>INHBC</i>	T	C	0.13	-0.072	0.007	2.2×10^{-25}
21	rs4149178	6	<i>SLC22A7</i>	A	G	0.84	-0.034	0.007	1.210^{-6}
22	rs478607	11	<i>NRXN2</i>	A	G	0.84	-0.047	0.007	4.4×10^{-11}
23	rs4970988	1	<i>ARNT</i>	A	G	0.36	-0.028	0.005	1.010^{-7}
24	rs642803	11	<i>OVOL1</i>	T	C	0.46	-0.036	0.005	2.9×10^{-13}

25	rs653178	12	<i>ATXN2</i>	A	G	0.85	-0.035	0.005	7.2×10^{-12}
26	rs6598541	15	<i>IGF1R</i>	A	G	0.36	0.043	0.006	4.8×10^{-15}
27	rs675209	6	<i>RREB1</i>	T	C	0.54	0.061	0.006	1.3×10^{-23}
28	rs6770152	3	<i>SFMBT1</i>	T	G	0.58	-0.044	0.005	2.6×10^{-16}
29	rs7188445	16	<i>MAF</i>	A	G	0.24	-0.032	0.005	1.6×10^{-9}
30	rs7193778	16	<i>NFAT5</i>	T	C	0.92	-0.046	0.008	8.2×10^{-10}
31	rs7224610	17	<i>HLF</i>	A	C	0.77	-0.042	0.005	5.4×10^{-17}
32	rs729761	6	<i>VEGFA</i>	T	G	0.16	-0.047	0.006	8.0×10^{-16}
33	rs7953704	12	<i>B3GNT4</i>	A	G	0.47	-0.029	0.005	2.6×10^{-8}
34	rs7976059	12	<i>ACVR1B- ACVRL1</i>	T	G	0.35	0.032	0.005	1.9×10^{-9}

A1: Alelo del efecto. F. A1: Frecuencia del alelo del efecto. Efecto: niveles del ácido úrico (mg/dl) E.S.: Error estándar. P: valor de p corregido por comparaciones múltiples. Nivel de significancia $< 6.8 \times 10^{-5}$.

	SNP	Cromosoma	gen	A1	A2	F A1	Etnicidad	Efecto	p
1	rs1165205	6	<i>SLC17A3</i>	A	T	0.694	Caucásico	-0.105	4.34×10^{-8}
2	rs11722228	4	<i>SLC2A9</i>	T	C	0.313	Asiático	0.202	6.54×10^{-26}
3	rs1183201	6	<i>SLC17A1</i>	T	A	0.707	Caucásico	-0.062	3.04×10^{-14}
4	rs12129861	1	<i>PDZK1</i>	A	G	0.324	Caucásico	-0.062	2.68×10^{-9}
5	rs12356193	10	<i>SLC16A9</i>	A	G	0.914	Caucásico	0.054	1.07×10^{-8}
6	rs16890979	4	<i>SLC2A9</i>	C	T	0.263	Asiático	-0.024	3.55×10^{-189}
7	rs17300741	11	<i>SLC22A11</i>	A	G	0.674	Caucásico	0.062	6.68×10^{-14}
8	rs2231142	4	<i>ABCG2</i>	C	T	0.119	Asiático	0.226	3.10×10^{-26}
9	rs505802	11	<i>SLC22A12</i>	T	G	0.427	Caucásico	-0.056	2.04×10^{-9}
10	rs6449213	4	<i>SLC2A9</i>	C	T	0.142	Caucásico	NR	3.15×10^{-12}
11	rs734553	4	<i>SLC2A9</i>	T	G	0.695	Asiático	0.315	5.22×10^{-201}
12	rs742132	6	<i>LRRC16A</i>	A	G	0.708	Caucásico	0.054	8.50×10^{-9}
13	rs7442295	4	<i>SLC2A9</i>	G	A	0.252	Caucásico	-0.02	1.85×10^{-15}
14	rs780094	2	<i>GCKR</i>	T	C	0.301	Caucásico	0.052	1.40×10^{-9}
15	rs877282	10	<i>DIP2C</i>	A	C	0.093	Caucásico	NR	4.56×10^{-8}

Tabla 26. SNP's de ácido úrico en población de diferente origen étnico.

*SNP's evaluados en la plataforma Affymetrix 6.0 y disponibles en GenPE. A1: Alelo del efecto. F. A1: Frecuencia del alelo del efecto. Efecto: niveles del ácido úrico (mg/dl). P: valor de p corregido por comparaciones múltiples. NR: No reportado (67, 94, 121-124)

Tabla 27. SNP's con significancia estadística identificados por UCLEB.

	SNP	Cromosoma	Gen	A1	Efecto	P
1	rs1021479	16	<i>IRF8</i>	T	0,514	3×10^{-7}
2	rs10490911	10	<i>RPL5P27, ENO4</i>	G	-0,549	$2,2 \times 10^{-8}$
3	rs10503564	8	<i>RPL32P19, MSR1</i>	A	-0,671	$3,6 \times 10^{-19}$
4	rs10515180	5	<i>RGNEF, ENC1</i>	A	0,74	$1,6 \times 10^{-20}$
5	rs10518558	4	<i>C4ORF33, CYCSP14SP14</i>	A	0,584	$2,6 \times 10^{-17}$

6	rs1106766	12	<i>R3HDM2, INHBC</i>	T	-5,16	2×10^{-11}
7	rs1183201	6	<i>SLC17A1</i>	A	-0,062	3×10^{-14}
8	rs12129861	1	<i>PDZK1</i>	A	-0,062	3×10^{-9}
9	rs12356193	10	<i>SLC16A9</i>	A	0,078	1×10^{-8}
10	rs1407728	6	<i>RPSAP43, FRK</i>	T	0,666	$6,6 \times 10^{-14}$
11	rs1528288	12	<i>PTPRQ</i>	T	0,678	$1,7 \times 10^{-12}$
12	rs17300741	11	<i>SLC22A11</i>	A	0,062	7×10^{-14}
13	rs1750231	21	<i>CYCSP41, BAGE3, MLL3</i>	NR	NR	$1,0 \times 10^{-7}$
14	rs190038	17	<i>CCL1, C17ORF102</i>	T	-0,359	$1,7 \times 10^{-10}$
15	rs2231142	4	<i>ABCG2</i>	T	0,173	1×10^{-10}
16	rs2281843	10	<i>GLRX3, TCERG1L</i>	G	-0,536	$4,8 \times 10^{-12}$
17	rs2544390	2	<i>LRP2</i>	C	NR	4×10^{-8}
18	rs362468	4	<i>ANK2</i>	T	0,606	$1,1 \times 10^{-7}$
19	rs4142923	16	<i>RBFOX1</i>	G	NR	8×10^{-6}
20	rs4745138	9	<i>C9ORF85</i>	T	0,623	$1,5 \times 10^{-8}$
21	rs505802	11	<i>SLC22A12</i>	T	-0,056	2×10^{-9}
22	rs675209	6	<i>BTF3P7, RREB1</i>	T	NR	1×10^{-23}
23	rs734553	4	<i>SLC2A9</i>	T	0,315	1×10^{-192}
24	rs742132	6	<i>LRRRC16A</i>	A	0,054	9×10^{-9}
25	rs780094	2	<i>GCKR</i>	T	0,052	1×10^{-9}
26	rs835189	5	<i>FYB, C9</i>	T	-0,839	$4,2 \times 10^{-14}$
27	rs835882	20	<i>ADRA1D</i>	G	0,502	$1,5 \times 10^{-8}$
28	rs958727	18	<i>ARIH2P1, DSC3</i>	T	-0,594	$1,1 \times 10^{-7}$

A1: Alelo del efecto. NR: No reportado

Bibliografía

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367(9516):1066-74.
3. Equipo Maternidad Segura SdPVyCeSP. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. MORTALIDAD MATERNA 2014:[91 p.]. Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Mortalidad%20materna.pdf>.
4. Rodríguez OC. Balance de los Objetivos del Milenio en Colombia. OASIS: Observatorio de Análisis de los Sistemas Internacionales. 2010(15):221-46.
5. National Collaborating Centre for Women's Health, Children's Health, National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Hypertension in Pregnancy: The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy. London: RCOG Press Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.; 2010.
6. Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, et al. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;359(9321):1877-90.
7. D'Anna R, Baviera G, Scilipoti A, Leonardi I, Leo R. The clinical utility of serum uric acid measurements in pre-eclampsia and transient hypertension in pregnancy. *Panminerva medica*. 2000;42(2):101-3.
8. Merviel P, Ba R, Beaufils M, Breart G, Salat-Baroux J, Uzan S. Lone hyperuricemia during pregnancy: maternal and fetal outcomes. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1998;77(2):145-50.
9. Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ, Oosthuisen MM. Antioxidants in the treatment of severe pre-eclampsia: an explanatory randomised controlled trial. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1997;104(6):689-96.
10. Schackis RC. Hyperuricaemia and preeclampsia: Is there a pathogenic link? *Medical hypotheses*. 2004;63(2):239-44.
11. Vineis P, Kriebel D. Causal models in epidemiology: past inheritance and genetic future. *Environmental health : a global access science source*. 2006;5:21.
12. Collaboration CRPCHDG. Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ (Clinical research ed)*. 2011;342.

13. JP. SNC. Proyecto GenPE - Genética y Preeclampsia 2001-2012. Available from: <http://www.genpe.org/>.
14. Das B, Verma SK, Samanta S, Mallick AK. Serum uric acid, triglycerides, total cholesterol and hdl-c measurements in pre-eclamptic women. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013;4(3):B422-B8.
15. Paşaoğlu H, Bulduk G, Öğüş E, Paşaoğlu A, Önalın G. Nitric oxide, lipid peroxides, and uric acid levels in pre-eclampsia and eclampsia. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2004;202(2):87-92.
16. Sahijwani D, Desai A, Oza H, Kansara V, Ninama P, Maheshwari K, et al. Serum uric acid as a prognostic marker of pregnancy induced hypertension. *Journal of SAFOG*. 2012;4(3):130-3.
17. Mulla MJ, Myrtolli K, Potter J, Boeras C, Kavathas PB, Sfakianaki AK, et al. Uric acid induces trophoblast IL-1beta production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2011;65(6):542-8.
18. Bainbridge SA, Roberts JM, Von Versen-Höynck F, Koch J, Edmunds L, Hubel CA. Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2009;297(2):C440-C50.
19. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(12):3553-62.
20. Park JH, Jin YM, Hwang S, Cho DH, Kang DH, Jo I. Uric acid attenuates nitric oxide production by decreasing the interaction between endothelial nitric oxide synthase and calmodulin in human umbilical vein endothelial cells: a mechanism for uric acid-induced cardiovascular disease development. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2013;32:36-42.
21. Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P. In preeclampsia, the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. *Hypertension*. 2005;45(2):258-63.
22. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric Acid as a Pathogenic Factor in Preeclampsia. *Placenta*. 2008;29(SUPPL.):67-72.
23. Martin AC, Brown MA. Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia? *Nature reviews Nephrology*. 2010;6(12):744-8.
24. Bargale A, Ganu JV, Trivedi DJ, Nagane N, Mudaraddi R, Sagare A. Serum hs-CRP and uric acid as indicator of severity in preeclampsia. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011;2(3):340-5.
25. Ghazavi A, Mosayebi G, Mashhadi E, Shariat-Zadeh MA, Rafiei M. Association of uric acid and C-reactive protein with severity of preeclampsia in Iranian women. *Journal of Medical Sciences*. 2008;8(3):239-43.
26. Kaypour F, Masomi Rad H, Ranjbar Novin N. The predictive value of serum uric acid, roll-over test, and body mass index in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006;92(2):133-4.

27. Punthumapol C, Kittichotpanich B. Serum calcium, magnesium and uric acid in preeclampsia and normal pregnancy. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2008;91(7):968-73.
28. Reyna-Villasmil E, Mejia-Montilla J, Reyna-Villasmil N, Torres-Cepeda D, Peña-Paredes E, Colmenares-Vega M, et al. Uric acid concentrations in patients with preeclampsia and eclampsia. *Concentraciones de ácido úrico en pacientes con preeclampsia y eclampsia*. 2008;35(5):160-5.
29. Weerasekera DS, Peiris H. The significance of serum uric acid, creatinine and urinary microprotein levels in predicting pre-eclampsia. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2003;23(1):17-9.
30. Conde A, Cifuentes R, Belizan J, Lede R, Bergel E. Prediction of pregnancy hypertensive disorders through calcium/creatinine relation and other laboratory exams. *PREDICCIÓN DE LOS TRASTORNOS HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO MEDIANTE LA RELACION CALCIO/CREATININA Y OTROS EXAMENES DE LABORATORIO*. 1994;45(4):299-304.
31. Hawkins TLA, Roberts JM, Mangos GJ, Davis GK, Roberts LM, Brown MA. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: A retrospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2012;119(4):484-92.
32. Bellomo G, Venanzi S, Saronio P, Verdura C, Narducci PL. Prognostic significance of serum uric acid in women with gestational hypertension. *Hypertension*. 2011;58(4):704-8.
33. Wu Y, Xiong X, Fraser WD, Luo ZC. Association of uric acid with progression to preeclampsia and development of adverse conditions in gestational hypertensive pregnancies. *American journal of hypertension*. 2012;25(6):711-7.
34. Meads CA, Cnossen JS, Meher S, Juarez-Garcia A, Ter Riet G, Duley L, et al. Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia: Systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technology Assessment*. 2008;12(6):1-249.
35. Cnossen J, De Ruyter-Hanhijärvi H, Van Der Post J, Mol B, Khan K, Ter Riet G. Accuracy of serum uric acid determination in predicting pre-eclampsia: A systematic review. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2006;85(5):519-25.
36. Thangaratinam S, Ismail KMK, Sharp S, Coomarasamy A, Khan KS. Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: A systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2006;113(4):369-78.
37. Koopmans CM, van Pampus MG, Groen H, Aarnoudse JG, van den Berg PP, Mol BWJ. Accuracy of serum uric acid as a predictive test for maternal complications in pre-eclampsia: Bivariate meta-analysis and decision analysis. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2009;146(1):8-14.

38. Pardo RG, H. Guías atención sobre las complicaciones hipertensivas asociadas con el embarazo Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. 2012.
39. Rubio-Romero JA, Ruiz-Parra AI, Martínez F, Muñoz-Restrepo J, Muñoz LA, Arévalo-Rodríguez I, et al. Guía de práctica clínica para la detección temprana de las anomalías durante el trabajo de parto, atención del parto normal y distócico. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2013;64(4):379-424.
40. Zhou J, Zhao X, Wang Z, Hu Y. Combination of lipids and uric acid in mid-second trimester can be used to predict adverse pregnancy outcomes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012;25(12):2633-8.
41. Wolak T, Sergienko R, Wiznitzer A, Paran E, Sheiner E. High uric acid level during the first 20 weeks of pregnancy is associated with higher risk for gestational diabetes mellitus and mild preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2012;31(3):307-15.
42. Laughon SK, Catov J, Powers RW, Roberts JM, Gandley RE. First trimester uric acid and adverse pregnancy outcomes. *American journal of hypertension*. 2011;24(4):489-95.
43. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2000;183(1):S1-s22.
44. Yang X, Peterson L, Thieringer R, Deignan JL, Wang X, Zhu J, et al. Identification and validation of genes affecting aortic lesions in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2414-22.
45. Luis Alfonso Díaz-Martínez NCS-D. OPORTUNIDADES DE INVESTIGACIÓN EN PREECLAMPSIA, DESDE LA PERSPECTIVA DE PREVENCIÓN PRIMARIA. UN ARTÍCULO DE REFLEXIÓN. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2008;59(3):9.
46. Estadística DANd. Estadísticas vitales - Mortalidad Materna Colombia 2014 [cited 2014]. Available from: <https://www.dane.gov.co/index.php/component/content/category/118>.
47. Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, Bell R. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *European journal of epidemiology*. 2013;28(1):1-19.
48. Gruslin A, Lemyre B. Pre-eclampsia: fetal assessment and neonatal outcomes. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011;25(4):491-507.
49. Díaz Martínez LA, Díaz Pedraza NdM, Serrano Díaz NC, Colmenares Mejía CC. El pronóstico de los hijos de madres con preeclampsia: Parte 2: efectos a largo plazo. *Archivos argentinos de pediatría*. 2011;109(6):519-24.
50. Bramham K, Parnell B, Nelson-Piercy C, Seed PT, Poston L, Chappell LC. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2014;348:g2301.
51. Rahman MM, Abe SK, Kanda M, Narita S, Rahman MS, Bilano V, et al. Maternal body mass index and risk of birth and maternal health outcomes in low-

and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2015.

52. Gallos ID, Sivakumar K, Kilby MD, Coomarasamy A, Thangaratinam S, Vatish M. Pre-eclampsia is associated with, and preceded by, hypertriglyceridaemia: a meta-analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2013;120(11):1321-32.

53. Miha D, Sabau L, Costin N, Ciortea R, Malutan A, Miha CM. Implications of maternal systemic oxidative stress in normal pregnancy and in pregnancy complicated by preeclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2012;25(7):944-51.

54. Valenzuela FJ, Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *J Pregnancy*. 2012;2012:632732.

55. Staines-Urias E, Paez MC, Doyle P, Dudbridge F, Serrano NC, Ioannidis JP, et al. Genetic association studies in pre-eclampsia: systematic meta-analyses and field synopsis. *International journal of epidemiology*. 2012;41(6):1764-75.

56. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010;37(2):239-53.

57. Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension*. 2013;62(6):1046-54.

58. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(5):1359-75.

59. Palei AC, Spradley FT, Warrington JP, George EM, Granger JP. Pathophysiology of hypertension in pre-eclampsia: a lesson in integrative physiology. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2013;208(3):224-33.

60. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(24):2856-69.

61. Alvarez-Lario B, Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010;49(11):2010-5.

62. Gersch C, Pali SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2008;27(8):967-78.

63. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. 2008;27(6):608-19.

64. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1791-9.

65. Bergamini C, Cicoira M, Rossi A, Vassanelli C. Oxidative stress and hyperuricaemia: pathophysiology, clinical relevance, and therapeutic implications in chronic heart failure. *European journal of heart failure*. 2009;11(5):444-52.

66. Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nature genetics*. 2013;45(2):145-54.
67. Kolz M, Johnson T, Sanna S, Teumer A, Vitart V, Perola M, et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS genetics*. 2009;5(6):e1000504.
68. Gustafsson D, Unwin R. The pathophysiology of hyperuricaemia and its possible relationship to cardiovascular disease, morbidity and mortality. *BMC nephrology*. 2013;14(1):164.
69. Gersch C, Palii SP, Imaram W, Kim KM, Karumanchi SA, Angerhofer A, et al. Reactions of peroxynitrite with uric acid: Formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2009;28(2):118-49.
70. Mazzali M, Hughes J, Kim Y-G, Jefferson JA, Kang D-H, Gordon KL, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*. 2001;38(5):1101-6.
71. Zhang W, Sun K, Yang Y, Zhang H, Hu FB, Hui R. Plasma uric acid and hypertension in a Chinese community: prospective study and metaanalysis. *Clin Chem*. 2009;55(11):2026-34.
72. Lv Q, Meng XF, He FF, Chen S, Su H, Xiong J, et al. High serum uric acid and increased risk of type 2 diabetes: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *PloS one*. 2013;8(2):e56864.
73. Kim SY, Guevara JP, Kim KM, Choi HK, Heitjan DF, Albert DA. Hyperuricemia and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(7):885-92.
74. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*. 2008;29 Suppl A:S67-72.
75. Ahaneku JE, Adinma JI, Ahaneku GI, Nwosu BO, Nwofor PC, Okoli CC. Serum urea and uric acid concentration in pregnant women in sub-urban commercial community in Africa. *Nigerian journal of clinical practice*. 2009;12(2):216-8.
76. Nwagha UI, Ejezie FE, Iyare EE. Evaluation of serum uric acid levels in normal pregnant Nigerian women. *Nigerian journal of clinical practice*. 2009;12(1):83-6.
77. Igarashi M, Miyake H, Suzuki S. Effect of changes in renal circulation on serum uric acid levels in women with twin pregnancy. *Clinical and experimental nephrology*. 2010;14(5):436-9.
78. Fischer RL, Bianculli KW, Hediger ML, Scholl TO. Maternal serum uric acid levels in twin gestations. *Obstet Gynecol*. 1995;85(1):60-4.
79. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005;366(9489):941-51.
80. Benke KS, Fallin MD. Methods: genetic epidemiology. *The Psychiatric clinics of North America*. 2010;33(1):15-34.
81. Cote ML. Study designs in genetic epidemiology. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2009;520:247-57.

82. Gieger C. Statistical Methods in Genetic and Molecular Epidemiology and Their Application in Studies with Metabolic Phenotypes. *Genetics Meets Metabolomics*: Springer; 2012. p. 39-56.
83. Serrano Díaz NC, Péz Leal MC, Martínez Linares MP, Casas Romero JP, Gil Urbano L, Navarro Mancilla AA. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. *MedUNAB*. 2002;5(15):185-92.
84. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002822.
85. Yang TH, Kon M, DeLisi C. Genome-wide association studies. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2013;939:233-51.
86. Johnson MP, Brennecke SP, East CE, Goring HH, Kent JW, Jr., Dyer TD, et al. Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene. *PloS one*. 2012;7(3):e33666.
87. Panagiotou OA, Willer CJ, Hirschhorn JN, Ioannidis JP. The power of meta-analysis in genome-wide association studies. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:441-65.
88. Yang B, Mo Z, Wu C, Yang H, Yang X, He Y, et al. A genome-wide association study identifies common variants influencing serum uric acid concentrations in a Chinese population. *BMC medical genomics*. 2014;7:10.
89. Charles BA, Shriner D, Doumatey A, Chen G, Zhou J, Huang H, et al. A genome-wide association study of serum uric acid in African Americans. *BMC medical genomics*. 2011;4:17.
90. Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, et al. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nature genetics*. 2010;42(3):210-5.
91. Karns R, Zhang G, Sun G, Rao Indugula S, Cheng H, Havas-Augustin D, et al. Genome-wide association of serum uric acid concentration: replication of sequence variants in an island population of the Adriatic coast of Croatia. *Annals of human genetics*. 2012;76(2):121-7.
92. Son CN, Bang SY, Cho SK, Sung YK, Kim TH, Bae SC, et al. The frequency of single nucleotide polymorphisms and their association with uric acid concentration based on data from genome-wide association studies in the Korean population. *Rheumatology international*. 2014;34(6):777-83.
93. Voruganti VS, Kent JW, Jr., Debnath S, Cole SA, Haack K, Goring HH, et al. Genome-wide association analysis confirms and extends the association of SLC2A9 with serum uric acid levels to Mexican Americans. *Frontiers in genetics*. 2013;4:279.
94. Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, et al. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *American journal of human genetics*. 2008;82(1):139-49.
95. Mendel G. Experimentos de hibridación en plantas: trabajo leído en las reuniones del 8 de febrero y del 8 de marzo de 1865: Universidad Nacional Autónoma de México; 1965.

96. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *International journal of epidemiology*. 2003;32(1):1-22.
97. Nitsch D, Molokhia M, Smeeth L, DeStavola BL, Whittaker JC, Leon DA. Limits to causal inference based on Mendelian randomization: a comparison with randomized controlled trials. *American journal of epidemiology*. 2006;163(5):397-403.
98. Burgess S, and Simon G. Thompson. . Mendelian Randomization: Methods for using Genetic Variants in Causal Estimation. . In: Press C, editor. What is Mendelian Randomization?2015.
99. Gray R, Wheatley K. How to avoid bias when comparing bone marrow transplantation with chemotherapy. *Bone Marrow Transplantation*. 1990;7:9-12.
100. Burgess S, Thompson SG. Avoiding bias from weak instruments in Mendelian randomization studies. *International journal of epidemiology*. 2011;40(3):755-64.
101. Burgess S, Thompson SG. Use of allele scores as instrumental variables for Mendelian randomization. *International journal of epidemiology*. 2013;42(4):1134-44.
102. Palmer TM, Nordestgaard BG, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Smith GD, Lawlor DA, et al. Association of plasma uric acid with ischaemic heart disease and blood pressure: mendelian randomisation analysis of two large cohorts. *BMJ (Clinical research ed)*. 2013;347:f4262.
103. Nussbaum M. Willard:"Thompson &Thompson. *Genética en Medicina*". Masson, SA Barcelona, 7ªed; 2008.
104. Williams MA, Carson R, Passmore P, Silvestri G, Craig D. Introduction to genetic epidemiology. *Optometry (St Louis, Mo)*. 2011;82(2):83-91.
105. Wellcome Trust Case Control Consortium. Available from: <http://www.wtccc.org.uk/>.
106. Burgess S. Sample size and power calculations in Mendelian randomization with a single instrumental variable and a binary outcome. *International journal of epidemiology*. 2014:dyu005.
107. Cleveland WS. LOWESS: A program for smoothing scatterplots by robust locally weighted regression. *American Statistician*. 1981:54-.
108. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaidis KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(1):66-74.
109. Shah T, Engmann J, Dale C, Shah S, White J, Giambartolomei C, et al. Population genomics of cardiometabolic traits: design of the University College London-London School of Hygiene and Tropical Medicine-Edinburgh-Bristol (UCLEB) Consortium. *PloS one*. 2013;8(8).
110. Johnson AD, Handsaker RE, Pulit SL, Nizzari MM, O'Donnell CJ, De Bakker PIW. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics*. 2008;24(24):2938-9.
111. Laughon SK, Catov J, Provins T, Roberts JM, Gandley RE. Elevated first-trimester uric acid concentrations are associated with the development of

- gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;201(4):402.e1-5.
112. Keenan T, Zhao W, Rasheed A, Ho WK, Malik R, Felix JF, et al. Causal Assessment of Serum Urate Levels in Cardiometabolic Diseases Through a Mendelian Randomization Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(4):407-16.
113. White J, Sofat R, Hemani G, Shah T, Engmann J, Dale C, et al. Plasma urate concentration and risk of coronary heart disease: a Mendelian randomisation analysis. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2016;4(4):327-36.
114. Kleber ME, Delgado G, Grammer TB, Silbernagel G, Huang J, Kramer BK, et al. Uric Acid and Cardiovascular Events: A Mendelian Randomization Study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(11):2831-8.
115. Kleinbaum DG, Klein M. Modeling strategy guidelines. *Logistic Regression*: Springer; 2010. p. 165-202.
116. Textor J, Liskiewicz M. Adjustment criteria in causal diagrams: An algorithmic perspective. *arXiv preprint arXiv:12023764*. 2012.
117. Schmidt JA, Crowe FL, Appleby PN, Key TJ, Travis RC. Serum uric acid concentrations in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: a cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort. *PloS one*. 2013;8(2):e56339.
118. Lamminpaa R, Vehvilainen-Julkunen K, Gissler M, Heinonen S. Preeclampsia complicated by advanced maternal age: a registry-based study on primiparous women in Finland 1997-2008. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012;12:47.
119. Kuo C-F, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;advance online publication.
120. Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2005;106(1):156-61.
121. Chen MH, Huang J, Chen WM, Larson MG, Fox CS, Vasan RS, et al. Using family-based imputation in genome-wide association studies with large complex pedigrees: the Framingham Heart Study. *PloS one*. 2012;7(12):e51589.
122. Dai X, Yuan J, Yao P, Yang B, Gui L, Zhang X, et al. Association between serum uric acid and the metabolic syndrome among a middle- and old-age Chinese population. *European journal of epidemiology*. 2013;28(8):669-76.
123. Nakayama A, Matsuo H, Shimizu T, Ogata H, Takada Y, Nakashima H, et al. A common missense variant of monocarboxylate transporter 9 (MCT9/SLC16A9) gene is associated with renal overload gout, but not with all gout susceptibility. *Human cell*. 2013;26(4):133-6.
124. Li WD, Jiao H, Wang K, Zhang CK, Glessner JT, Grant SF, et al. A genome wide association study of plasma uric acid levels in obese cases and never-overweight controls. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2013;21(9):E490-4.