



Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Estudio de los niveles séricos de estroncio en la preeclampsia y otras patologías del embarazo

Tesis Doctoral

Clara Barneo Caragol

2019

Contenidos:

Autorización para la presentación de Tesis Doctoral.....	III
Resolución de presentación de Tesis Doctoral.....	V
Resumen.....	IX
Formulario resumen de tesis por compendio.....	XIII
Informe para la presentación de Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.....	XV
Aceptación de coautores para la presentación de trabajos formando parte de Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.....	XVI
Renuncia de coautores para la presentación de trabajos formando parte de otra tesis doctoral.....	XXI
Agradecimientos.....	XXIII
Abreviaturas.....	XXV
Índice de Contenidos.....	XXVII
Índice de Figuras.....	XXIX
Índice de Tablas.....	XXX



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Estudio de los niveles séricos de estroncio en la preeclampsia y otras patologías del embarazo	Inglés: Study of serum levels of strontium in preeclampsia and other pathologies of pregnancy
2.- Autor	
Nombre: Clara Barneo Caragol	
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado	

RESUMEN (en español)

Esta tesis doctoral se ha centrado en dilucidar la posible utilidad de las concentraciones séricas de estroncio como marcador de preeclampsia, así como en identificar las causas de su alteración. Inicialmente, se evaluó la cinética de las concentraciones séricas del estroncio, otros elementos traza, el estrés oxidativo, el calcio y el ácido úrico a lo largo del embarazo de gestantes sanas, evidenciando una cinética diferente del estroncio respecto a otros elementos traza, y una relación directa de este elemento con el ácido úrico y el estado oxidativo. Posteriormente, se evaluó el estroncio en la preeclampsia. Los niveles séricos de estroncio, estrés oxidativo, calcio, ácido úrico, función cardioventricular y estado angiogénico en gestantes con preeclampsia en la última muestra disponible previa al parto, y en el 1^{er} trimestre de embarazo, se compararon con los hallados en gestantes sanas o con hipertensión gestacional. Se evidenció una elevación significativa de estroncio en gestantes con preeclampsia antes del parto, pero no en el 1^{er} trimestre, pudiendo confirmar de nuevo la relación entre estroncio, ácido úrico y estado oxidativo, y descartando posibles interacciones con el calcio o la función cardioventricular. Finalmente, se evaluaron los niveles séricos de estroncio como biomarcador diferencial entre preeclampsia y otras patologías del embarazo: crecimiento intraútero retardado e hipertensión gestacional. Se compararon los niveles de estroncio, estrés oxidativo, ácido úrico, estado angiogénico y función renal al inicio de los síntomas, así como las concentraciones de estroncio unas semanas antes. Observamos una elevación significativa del estroncio



en gestantes con preeclampsia precoz al inicio de los síntomas, pero no con anterioridad. Los hallazgos descritos, junto con las relaciones encontradas entre el estroncio y otros parámetros, como por ejemplo la relación intraindividual inversa con la función renal, y directa con un estado anti-angiogénico, así como la evidencia científica de una relación directa con un metabolismo óseo alterado, sugieren la posibilidad de que no una, sino varias condiciones patológicas propias de la preeclampsia son las que podrían determinar las variaciones en la concentración sérica de este elemento, siendo necesarios futuros estudios diseñados para entender la relación entre el estroncio y la fisiopatogenia de la preeclampsia.

RESUMEN (en inglés)

This PhD Thesis has focused on elucidating the possible utility of serum concentrations of strontium as a marker of preeclampsia, as well as identifying the causes of its alteration. Initially, the kinetics of the serum concentrations of strontium, other trace elements, oxidative stress, calcium and uric acid throughout healthy pregnancies were evaluated, demonstrating a different trend in strontium levels compared to other trace elements, and a direct relationship of this element with uric acid and the oxidative state. Subsequently, strontium was evaluated in preeclampsia. The serum levels of strontium, oxidative stress, calcium, uric acid, cardiovascular function and angiogenic state in pregnant women with preeclampsia in the last sample available before delivery, and in the 1st trimester of pregnancy, were compared with those found in healthy pregnant women or with gestational hypertension. A significant elevation of strontium was observed in pregnant women with preeclampsia before delivery, but not in the 1st trimester, confirming again the relationship between strontium, uric acid and oxidative state, and ruling out possible interactions with calcium or cardiovascular function. Finally, the serum levels of strontium were evaluated as a differential biomarker between preeclampsia and other pathologies of pregnancy: intrauterine growth retardation and gestational hypertension. The levels of strontium, oxidative stress, uric acid, angiogenic state and renal function were compared at symptoms onset, as well as the strontium concentrations several weeks earlier. We observed a significant elevation of strontium in pregnant women with early-onset preeclampsia at symptoms onset, but not before. The described findings, together with the relationships found between strontium and other parameters, such as the inverse intraindividual relationship with renal function, and direct with an anti-angiogenic state, as well as the scientific evidence of a direct relationship with an altered bone metabolism, suggest the



possibility that not one, but several pathological conditions of preeclampsia could determine the variations in the serum concentration of this element, being necessary future studies designed to understand the relationship between strontium and the physiopathogenesis of preeclampsia.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



FORMULARIO RESUMEN DE TESIS POR COMPENDIO

1.- Datos personales solicitante	
Apellidos: Barneo Caragol	Nombre: Clara

Curso de inicio de los estudios de doctorado	2015/2016
--	-----------

	SI	NO
Acompaña acreditación por el Director de la Tesis de la aportación significativa del doctorando	x	

Acompaña memoria que incluye

Introducción justificativa de la unidad temática y objetivos	x	
Copia completa de los trabajos *	x	
Resultados/discusión y conclusiones	x	
Informe con el factor de impacto de las publicaciones	x	

Se acompaña aceptación de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como tesis por compendio	x	
---	---	--

Se acompaña renuncia de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como parte de otra tesis de compendio	x	
--	---	--

* Ha de constar el nombre y adscripción del autor y de todos los coautores así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación por parte de la revista o editorial

Artículos, Capítulos, Trabajos

Trabajo, Artículo 1

Título

Strontium and oxidative stress in normal pregnancy

Fecha de publicación

Enero/2018

Fecha de aceptación

Septiembre/2017

Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI

PubMed



Factor de impacto

3.755

Coautor2	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Eduardo Martínez Morillo

Coautor3	Doctor	x No doctor
----------	--------	-------------

Susana Rodríguez González

Coautor4	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Paloma Lequerica Fernández

Coautor5	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Ignacio Vega Naredo

Coautor6	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Francisco V. Álvarez Menéndez

Trabajo, Artículo 2

Título

Strontium and its role in preeclampsia
--

Fecha de publicación

Mayo/2018

Fecha de aceptación

Enero/2018

Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI

PubMed

Factor de impacto

3.755

Coautor2	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Eduardo Martínez Morillo

Coautor3	Doctor	x No doctor
----------	--------	-------------

Susana Rodríguez González

Coautor4	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Paloma Lequerica Fernández

Coautor5	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Ignacio Vega Naredo

Coautor6	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Francisco V. Álvarez Menéndez

Trabajo, Artículo 3

Título

Increased serum strontium levels and altered oxidative stress status in early-onset preeclampsia
--

Fecha de publicación

Mayo/2019

Fecha de aceptación

Mayo/2019

Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI

PubMed

Factor de impacto

6.020

Coautor2	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Eduardo Martínez Morillo

Coautor3	Doctor	x No doctor
----------	--------	-------------

Susana Rodríguez González

Coautor4	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Paloma Lequerica Fernández

Coautor5	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Ignacio Vega Naredo

Coautor6	x Doctor	No doctor
----------	----------	-----------

Francisco V. Álvarez Menéndez

Agradecimientos

Al Dr. Álvarez, quien me dio la oportunidad de elaborar esta tesis doctoral desde el primer momento que manifesté el deseo de realizarla, depositando en mí su confianza durante estos años. Gracias por ser la espuela, el empuje necesario.

Al Dr. Martínez Morillo; sin él esta tesis no hubiera sido posible. Muchas gracias por su confianza, su apoyo, su paciencia, su generosidad por estar siempre dispuesto a discutir nuestros distintos puntos de vista, compartir sus conocimientos, orientarme sobre qué dirección seguir en cada encrucijada del camino, respetando siempre mi propio criterio. Por hacer fácil lo difícil.

A la Dra. Escudero, por su colaboración y ayuda con los diagnósticos.

Al Departamento de Morfología y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, en especial a Nacho y Susana, por colaborar en este proyecto de tantas formas, bien analizando muestras y aportando conocimientos, o bien con su actitud siempre positiva y sus ánimos de “¡ya queda menos!”.

Al personal de extracciones, en especial a Lali y a Clara, por su ayuda en el reclutamiento de participantes, y a Vero, por ayudarme con la seroteca. Gracias también a las participantes del estudio.

A mis compañeros del Servicio de Bioquímica, en especial a Elisa, Anabel, Indira, Pablo, Adela, Carmen, Leyre, María, Elena Añón, Juan Carlos, Conchí, Elena, Esther, Chus, Asun, Reme, Sergio, Sonia...; todos ellos han hecho que los momentos más difíciles de la residencia fueran más llevaderos, y me han enseñado mucho más de lo que ellos creen, más allá de la profesión. Gracias.

A mis amigos, en especial a Lele, María, Alicia, Raquel, Vero, Lucía, Elisa, Laura, Canderina..., porque, aunque no les veo tanto como quisiera, siempre están ahí para escucharme, disfrutar de un rato agradable y servirme de inyección de ánimos.

A mi familia: a mi padre, por ser mi estrella polar, impulsor de mis mayores logros, y a mi madre, por estar ahí siempre, dispuesta a escuchar. Ambos me han enseñado el valor del esfuerzo, el sacrificio, la voluntad. A mis hermanos, en especial a Inés, hermana y amiga, para mí un ejemplo de superación. A mi tía Chari y a mi prima Lucía, porque, aunque en la distancia, sus palabras siempre son de cariño y ánimo. A mis abuelas.

A Eider, por ser mi oasis en el desierto, el hombre en el que apoyarme, por enseñarme la escuela de la vida. Por asumir, y entender. A Yara y a Diana, por entrar e interrumpir continuamente mi concentración al ordenador, por sus besos, sus “te amo”, su amor infinito. Hasta Sirio y más allá. Por hacerme niña otra vez. Ellas no lo saben, pero han sido las únicas capaces de enseñarme el verdadero sentido de la vida.

Abreviaturas

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AUC: área bajo la curva

Ca: calcio

CAT: catalasa

CIR: crecimiento intraútero retardado

CIRP: crecimiento intraútero retardado precoz

CIRT: crecimiento intraútero retardado tardío

Co: cobalto

Cu: cobre

ERO: especies reactivas de oxígeno

GPx: glutatión peroxidasa

HELLP: hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas

HTAG: hipertensión gestacional

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

ICP-MS: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

MDA: malondialdehído

NT-proBNP: fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B

O₂: oxígeno molecular

PE: preeclampsia

PEP&CIR: preeclampsia precoz con crecimiento intraútero retardado añadido

PEP: preeclampsia precoz

PET: preeclampsia tardía

PIGF: factor de crecimiento placentario

PRAC: Pharmacovigilance Risk Assessment Committee, Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia

ROC: receiver operating characteristics, características operativas del receptor

Se: selenio

sEng: endoglina soluble

sFlt-1: receptor soluble de tirosín quinasa

SOD: superóxido dismutasa

Sr: estroncio

TFGe: tasa de filtrado glomerular estimada

TGF: factor de crecimiento transformante (α , β)

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR-1: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1

Zn: zinc

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	1
1.1 Preeclampsia y otros trastornos del embarazo.....	3
1.1.1 Epidemiología.....	6
1.1.2 Factores de riesgo.....	7
1.1.3 Fisiopatología.....	8
1.1.4 Diagnóstico.....	14
1.1.4.1 Marcadores bioquímicos.....	14
1.1.5 Complicaciones maternas y perinatales.....	17
1.1.5.1 Hipertensión gestacional.....	17
1.1.5.2 Preeclampsia.....	18
1.1.5.3 Crecimiento intraútero retardado.....	19
1.2 Estrés oxidativo.....	20
1.2.1 Generalidades.....	20
1.2.2 Marcadores de estrés oxidativo.....	22
1.2.3 Estrés oxidativo en el embarazo.....	23
1.2.4 Estrés oxidativo y preeclampsia.....	24
1.3 Elementos traza.....	28
1.3.1 Generalidades.....	28
1.3.2 Papel en el organismo y el embarazo.....	28
1.3.3 El Estroncio.....	29
1.3.4 Papel de algunos elementos traza en la preeclampsia.....	31
2. Justificación e Hipótesis.....	33

3. Objetivos.....	37
4. Resultados.....	41
4.1 Estroncio y estrés oxidativo en el embarazo normal.....	44
4.2 Estroncio y su papel en la preeclampsia.....	55
4.3 Niveles incrementados de estroncio y estatus oxidativo alterado en la preeclampsia precoz.....	71
5. Discusión.....	87
5.1 Estroncio y otros elementos traza en el embarazo sano.....	89
5.2 Estroncio en la preeclampsia, hipertensión gestacional y crecimiento intraútero retardado.....	90
5.3 Estroncio, calcio y metabolismo óseo.....	95
5.4 Estroncio, ácido úrico y estrés oxidativo.....	98
5.5 Estroncio, NT-proBNP y función cardiovascular.....	101
5.6 Estroncio, relación sFlt-1/PIGF y estado angiogénico.....	103
5.7 Estroncio, tasa de función glomerular estimada y función renal.....	105
5.8 Futuros estudios necesarios para entender la posible relación entre los niveles séricos de estroncio y la preeclampsia.....	107
6. Conclusiones.....	111
7. Anexos.....	115
8. Bibliografía.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Diagnóstico final de las 688 pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del HUCA con sospecha de PE (periodo 2015-2017)</i>	7
Figura 2. <i>Fracaso de la transformación fisiológica de las arterias espirales implicado en la PE</i>	9
Figura 3. <i>Arterias espirales del miometrio transformadas y no transformadas</i>	9
Figura 4. <i>Esquema de la patogénesis de la PE</i>	11
Figura 5. <i>Fisiopatología en dos pasos de la PE</i>	12
Figura 6. <i>Modelo que sugiere el síndrome metabólico como la clave que diferencia PE y CIR</i>	13
Figura 7. <i>Las concentraciones séricas maternas de la relación sFlt-1 / PIGF durante el embarazo</i>	16
Figura 8. <i>Reducción total del oxígeno molecular</i>	20
Figura 9. <i>Mecanismos de la disfunción endotelial en la PE</i>	26
Figura 10. <i>Resultados más relevantes del estudio “Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy”</i>	32
Figura 11. <i>Evolución Cu, Se, Zn y Sr durante el embarazo sano</i>	89
Figura 12. <i>Niveles de Sr en mujeres no embarazadas y a lo largo del embarazo en gestantes sanas y gestantes con distintas patologías</i>	92
Figura 13. <i>Resultados más relevantes de las concentraciones de MDA, CAT y GPx en hígado (A) y riñón (B) de ratas tras ser ovariectomizadas</i>	100
Figura 14. <i>Correlación entre las concentraciones de Sr y la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) en gestantes con PEP</i>	106
Figura 15. <i>Futuros estudios necesarios para entender la posible relación entre los niveles séricos de estroncio y la preeclampsia</i>	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación de la PE</i>	5
Tabla 2. <i>Hallazgos severos de la PE</i>	5
Tabla 3. <i>Factores de riesgo compartidos por la PE, HTAG y CIR</i>	8
Tabla 4. <i>Complicaciones maternas y fetales en PE severa</i>	18
Tabla 5. <i>Sistema antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos</i>	21
Tabla 6. <i>Esquema representativo de los métodos más empleados en la determinación del daño oxidativo</i>	22
Tabla 7. <i>Evidencia de estrés oxidativo en sangre y tejidos de mujeres con PE</i>	24
Tabla 8. <i>Datos de rendimiento diagnóstico al utilizar las concentraciones de Sr como biomarcador de PE, al final de la gestación o al inicio de los síntomas</i>	94

1. Introducción

1. Introducción

1.1 Preeclampsia y otros trastornos del embarazo

La preeclampsia (PE), la hipertensión gestacional (HTAG) y el crecimiento intraútero retardado (CIR) constituyen tres patologías obstétricas que necesitan asistencia sanitaria urgente, y que se presentan con distintos grados de severidad, tanto para la madre como para el feto.

Se pueden definir como:

- **Preeclampsia:** la definición clásica (1) es aparición de HTAG y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación. Pero en los últimos años se acepta que, en ausencia de proteinuria, existe PE si junto a la hipertensión de novo se presenta alguno de los siguientes hallazgos: trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ μl), insuficiencia renal (creatinina >1.1 mg/dL), alteración de la función hepática (elevación de la concentración de las enzimas hepáticas de, al menos, el doble de su límite superior de referencia), edema pulmonar y síntomas cerebrales y/o visuales (2). El síndrome conocido como HELLP (hemólisis intravascular, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas) es una forma severa de PE que se presenta con daño hepatocelular.
- **Hipertensión gestacional:** presión sanguínea $\geq 140/90$ mmHg en dos ocasiones separadas por, al menos, 24 horas a partir de la semana 20 de gestación, y en ausencia de proteinuria o de los hallazgos sistémicos previamente mencionados (2). Esta hipertensión gestacional puede clasificarse como leve, moderada o severa, según los niveles de presión sanguínea alcanzados ($\leq 149/99$, 150-159/100-109 y $\geq 160/110$ mmHg, respectivamente) (3).
- **Crecimiento intraútero retardado:** peso fetal por debajo del percentil 10 (p10) debido a un proceso patológico que inhibe la expresión del crecimiento potencial normal, presentándose a partir de la semana 22 de gestación con oligohidramnios (índice de líquido amniótico $<p10$) o con un índice de pulsatilidad de la arteria umbilical en ecografía Doppler mayor del percentil 95 (p95) (4).

De las anteriores definiciones se desprende que la HTAG puede considerarse un estado transitorio que, en algunos casos, puede evolucionar a PE si va acompañada de proteinuria o alguno de los otros hallazgos previamente mencionados. Por tanto, es importante reevaluar cada caso y clasificarlo correctamente acorde a los síntomas observados en cada momento, debido a que su pronóstico y manejo clínico serán distintos, suponiendo esto un desafío para los clínicos, dadas las similitudes existentes entre estos trastornos. La PE y la HTAG comparten un estado hipertensivo y muchos factores de riesgo (5). El CIR, aunque parece ser una entidad independiente, comparte con la PE la existencia de una insuficiencia placentaria (5-7), por lo que ambas, junto al desprendimiento de placenta, constituyen el grupo de enfermedades placentarias isquémicas (8). Hay que tener en cuenta que la PE es un síndrome puramente materno, donde el feto muestra un crecimiento y desarrollo normales en la gran mayoría de los casos, mientras que en las gestantes con CIR, el síndrome es exclusivamente fetal, sin patología materna, pudiendo acarrear graves consecuencias si se produce al comienzo del 3^{er} trimestre de embarazo (9) y no se diagnostica a tiempo (10).

Por otro lado, la PE y el CIR pueden subclasificarse en función de la edad gestacional de aparición, siendo PE precoz (PEP) o CIR precoz (CIRP) si aparecen antes de las 34 semanas de gestación, y PE tardía (PET) o CIR tardío (CIRT), si lo hacen a las 34 semanas en adelante. Esta clasificación connota no sólo una diferencia en el momento de aparición de la enfermedad, sino en el manejo clínico, grado de severidad, y pronóstico. En el caso de la PE, las formas precoz y tardía tienen distintos mecanismos fisiopatológicos, siendo consideradas como dos entidades diferentes (11, 12). Así, la forma precoz está relacionada con un factor predominantemente placentario, mientras que la tardía lo está con un factor materno (tabla 1). Del mismo modo, se ha constatado que el CIRP tiene una expresión fenotípica, evolución, y desenlace distintos a los observados en el CIRT (13), estando el primero más relacionado con una placentación anómala (14), al igual que ocurre con la PEP.

PEP (< semana 34*)	PET (≥ semana 34*)
Poco común (prevalencia 0.38% o 12% de todas las PE) (15)	Mayoría de los casos de PE (prevalencia 2.72% o 88% de todas las PE) (15)
Lesiones vellosas y vasculares extensas de la placenta	Lesiones placentarias mínimas
Mayor riesgo de complicaciones maternas y fetales que la PET	Los factores maternos (como el síndrome metabólico y la hipertensión) juegan un rol importante La mayoría de los casos de eclampsia* y muerte materna ocurren en la enfermedad tardía
* Edad gestacional al diagnóstico o al parto (16, 17)	

Tabla 1. Clasificación de la PE. • Eclampsia: complicación de la PE caracterizada por el desarrollo de convulsiones que no se pueden atribuir a otra causa (1). Adaptado de Chaiworapongsa et al (18).

La PE también puede clasificarse según presente o no características severas (2), las cuales se encuentran descritas en la tabla 2.

- Presión arterial sistólica ≥ 160 mmHg, o presión arterial diastólica ≥ 110 mmHg en dos ocasiones con ≥ 4 h de diferencia, mientras la paciente está en reposo
- Recuento de plaquetas < 100000 por mm^3
- Enzimas hepáticas elevadas (concentración de, al menos, dos veces el límite superior de referencia)
- Insuficiencia renal (concentración sérica de creatinina $> 1,1$ mg/dl o duplicación de la concentración sérica de creatinina) u oliguria (< 500 ml en 24 h)
- Edema pulmonar o cianosis
- Trastornos cerebrales o visuales de nueva aparición
- Dolor epigástrico severo y persistente en el cuadrante superior derecho

Tabla 2. Hallazgos severos de la PE (uno o más de los mostrados). Adaptado de Sibai et al (19).

La presencia de severidad supone un incremento de las tasas de desprendimiento de placenta, y de mortalidad y morbilidad perinatal y materna, siendo dichas tasas aún mayores si se presentan en la forma precoz (PE precoz severa), mientras que, en la PE sin hallazgos severos, las tasas obtenidas no son diferentes a las encontradas en gestantes normotensas (20-22).

1.1.1 Epidemiología

La PE afecta al 2-8% de las embarazadas de forma global (8), y, en concreto, en España se estima una prevalencia del 1% de las gestantes (23). Algunos estudios apuntan a un aumento de la incidencia en la última década en los países desarrollados (24), probablemente debido a una mayor frecuencia de las condiciones que predisponen a la enfermedad, como son una edad materna mayor y las gestaciones múltiples. La HTAG afecta al 2-17% de las gestantes (25), siendo esta prevalencia del 1.3% en España (23). El CIR está presente en el 3-5% de las gestaciones (8), aunque co-existe en un porcentaje significativo con la PE, por la placentación anómala común. Así, la prevalencia de CIR entre las gestantes con PE en un estudio con casi 40000 embarazadas (26) fue de un 22.2%. Además, existe asociación con el momento en el que se inicie la PE: las mujeres con PEP tienen 7 veces más riesgo de tener un feto con CIR respecto a las mujeres sin PE, mientras que el riesgo en las mujeres con PET es 3 veces mayor (8).

Respecto a la mortalidad, los desórdenes hipertensivos supusieron, entre los años 2003-2009, el 14% de todas las muertes maternas a nivel mundial, con estimaciones regionales sustancialmente variables (10.3 – 22.1%) (27), siendo responsables anualmente de aproximadamente 25000 muertes maternas en África, 22000 en Asia, 3800 en América Latina y 150 en los países desarrollados (28).

Nuestro centro, el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), atiende a la población del área sanitaria IV del Principado de Asturias (71613 mujeres entre 15 y 50 años, en el año 2017, según los datos del registro de la Dirección General de Planificación Sanitaria de la Consejería de Sanidad y la Sociedad Asturiana de Estudios Económicos e Industriales). Pero, además, es centro de referencia para el resto de las áreas sanitarias de la comunidad autónoma, por lo que, ante determinadas patologías graves o con un manejo clínico complejo, las pacientes son derivadas al HUCA. Anualmente, se realiza un control rutinario del embarazo a aproximadamente 2300 embarazadas, y en el periodo concreto 2015 – 2017, un total de 688 gestantes acudieron al Servicio de Urgencias por presentar sintomatología sugerente de PE,

solicitando atención sanitaria urgente un total de 1390 veces. Finalmente, el 20.3, 17.0 y 7.3% de estas gestantes fueron diagnosticadas de PE (incluyendo el síndrome de HELLP), HTAG y CIR, respectivamente. La incidencia de CIR en las gestantes con PE fue de un 16.7%. Los distintos diagnósticos pueden verse en la figura 1.

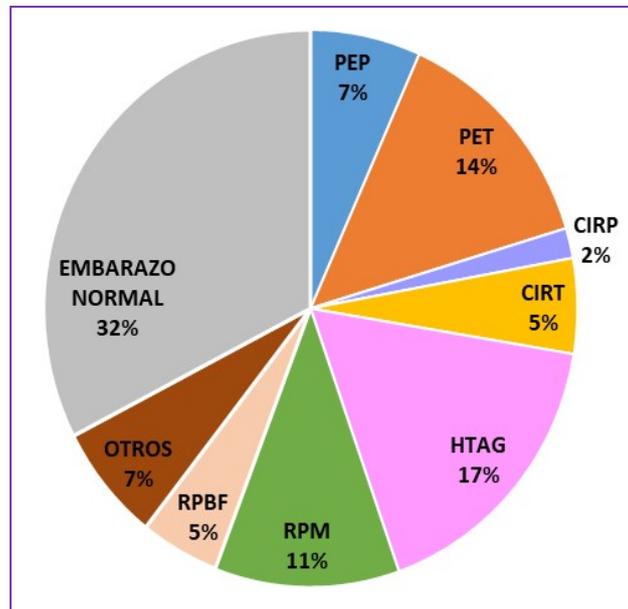


Figura 1. Diagnóstico final de las 688 pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del HUCA con sospecha de PE (periodo 2015-2017). CIRP, crecimiento intraútero retardado precoz; CIRT, crecimiento intraútero retardado tardío; HTAG, hipertensión gestacional; PEP, preeclampsia precoz; PET, preeclampsia tardía; RPBF, riesgo de pérdida del bienestar fetal; RPM, rotura prematura de membranas; Otros: incluye HTAG crónica, HTAG transitoria, aborto, oligohidramnios, PE previa, muerte fetal, otros. Embarazo normal: aquellos en los que la gestación transcurrió sin ninguna patología aparente, incluidas las mencionadas.

1.1.2 Factores de riesgo

Existe una serie de condiciones que predisponen, en mayor o menor grado, al desarrollo de alguna de las patologías descritas, y que son compartidas en algunos casos debido a las similitudes existentes entre los trastornos (tabla 3).

HTAG	PE	CIR
Obesidad (IMC >30kg/m ²)		Disfunción placentaria (HTAG, PE)
PE en gestación previa		CIR en gestación previa
Diabetes, enfermedad renal o cardíaca		
Infección del tracto urinario		
Infección del tracto reproductivo, cirugía del tracto reproductivo	Afecciones respiratorias crónicas	
Edad materna mayor		
		Edad materna extrema
Hijo previo nacido "grande para la edad gestacional"	Nuliparidad	
Hemorragia anteparto		
Embarazos múltiples		

Tabla 3. Factores de riesgo compartidos por la PE, HTAG y CIR. IMC, índice de masa corporal. Adaptado de Villar et al (5).

Así mismo, también se han encontrado diferencias en los factores de riesgo según se trate de PEP o PET (15). La hipertensión crónica está más relacionada con la aparición de PEP, mientras que el sobrepeso/obesidad, nuliparidad, y diabetes mellitus, lo están con la forma tardía. Este hecho apoya la teoría de que ambas son entidades clínicas independientes, tal y como se ha mencionado previamente. Por otro lado, existen factores maternos, fetales, placentarios y genéticos que contribuyen de forma independiente a la aparición del CIR (10).

1.1.3 Fisiopatología

La hipótesis central que explica la fisiopatología de la PE es la existencia de una isquemia placentaria provocada por una transformación anómala de las arterias espirales uterinas (figuras 2 y 3).

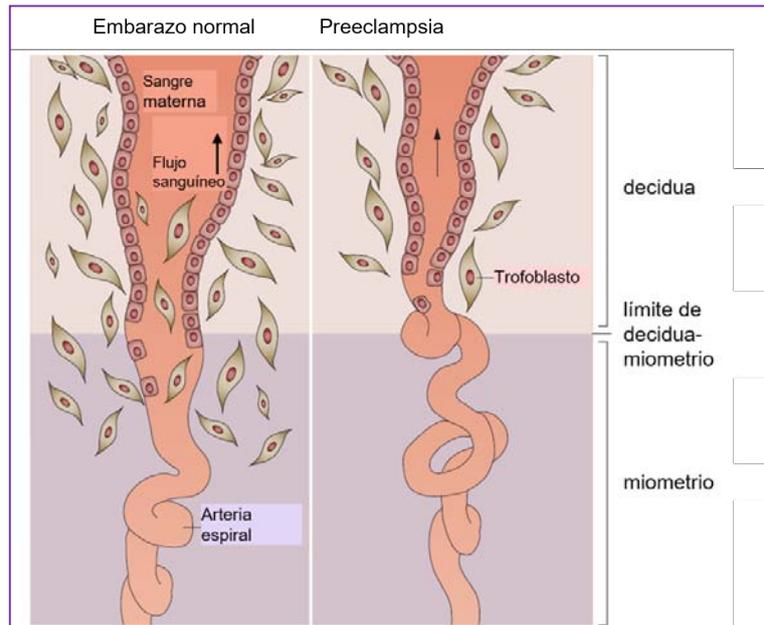


Figura 2. Fracaso de la transformación fisiológica de las arterias espirales implicado en la PE. A la izquierda, transformación fisiológica de las arterias espirales en el miometrio, en un embarazo normal, con trofoblastos en los segmentos decidual y miometrial, que convierten las arterias en vasos de gran calibre e incrementan el suministro de sangre al espacio intervelloso. A la derecha se observa una característica clave asociada al fracaso de la transformación de las arterias espirales en los embarazos afectados con PE: la falta de invasión de los trofoblastos en el segmento miometrial de la arteria espiral, produciéndose así arterias espirales estrechas, un patrón de flujo sanguíneo perturbado y una perfusión útero-placentaria reducida. Modificado de Chaiworapongsa et al (18).

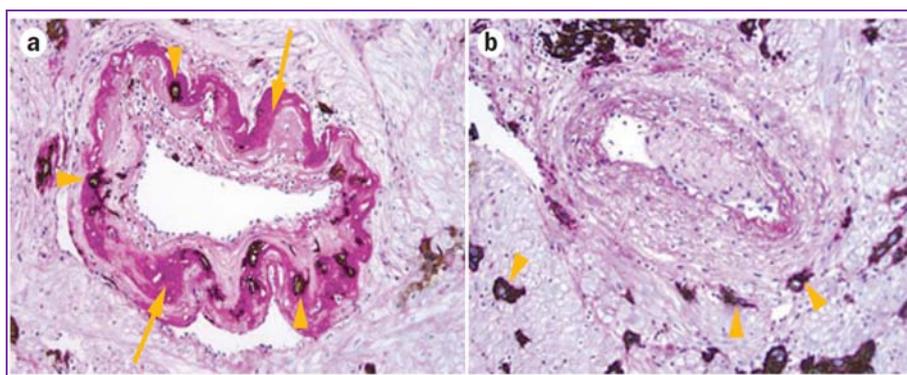


Figura 3. Arterias espirales del miometrio transformadas y no transformadas. a) Las arterias espirales transformadas se caracterizan por la presencia de trofoblastos intramurales (puntas de flecha) y degeneración fibrinoide (flechas) de la pared arterial. b) Las arterias espirales no transformadas carecen de trofoblastos intramurales y degeneración fibrinoide, y retienen contornos arteriales intactos. Las puntas de flecha indican la presencia de trofoblastos en el miometrio, pero no en la pared de la arteria espiral. Ambas imágenes se tiñeron con citoqueratina 7 (marrón) y ácido peryódico-Schiff (rosa), aumento $\times 200$ (29).

Durante el embarazo normal, los trofoblastos invaden la pared arterial, destruyen la túnica media y transforman las arterias espirales uterinas, aumentando su diámetro para permitir una perfusión adecuada de la placenta (30). Este proceso, regulado por la presión parcial de oxígeno, factores de crecimiento, hormonas y otras moléculas de señalización (31), permite un incremento de hasta diez veces el aporte sanguíneo hacia el espacio intervilloso. En cambio, en la PE, esta transformación es deficiente por lo que se limita el flujo sanguíneo hacia el feto, produciéndose la consecuente hipoxia placentaria que, al liberar determinados factores a la circulación, provocará las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esta es una afección multisistémica que incluye alteraciones renales, hepáticas, cerebrales, vasculares, pancreáticas y cardiopulmonares.

La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes es, por tanto, esencial para un embarazo exitoso (32). Sin embargo, en la PE existe un desequilibrio entre la producción y liberación de factores angiogénicos y anti-angiogénicos, dando lugar a un estatus marcadamente anti-angiogénico (33). Así, se encuentran concentraciones elevadas de factores anti-angiogénicos, como el receptor soluble de tirosín quinasa (sFlt-1) y la endoglina soluble (sEng), y concentraciones disminuidas de factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento placentario (PlGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (34) (figura 4).

El VEGF se trata de una familia de moléculas que incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF, y todas ellas estimulan el crecimiento de vasos sanguíneos a través de distintos mecanismos (35). Actúan uniéndose a sus receptores tirosin quinasa, como el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1 (VEGFR-1). Por otro lado, el sFlt-1 es la forma soluble del VEGFR-1, y actúa uniéndose a PlGF y a VEGF con gran afinidad, bloqueando así la angiogénesis placentaria (33). La endoglina es un co-receptor de la superficie celular para algunas isoformas del factor de crecimiento transformante (TGF), y actúa promoviendo la angiogénesis. La sEng es la forma soluble del co-receptor, y dificulta la unión del TGF a la endoglina, contribuyendo así al desarrollo de la PE (36).

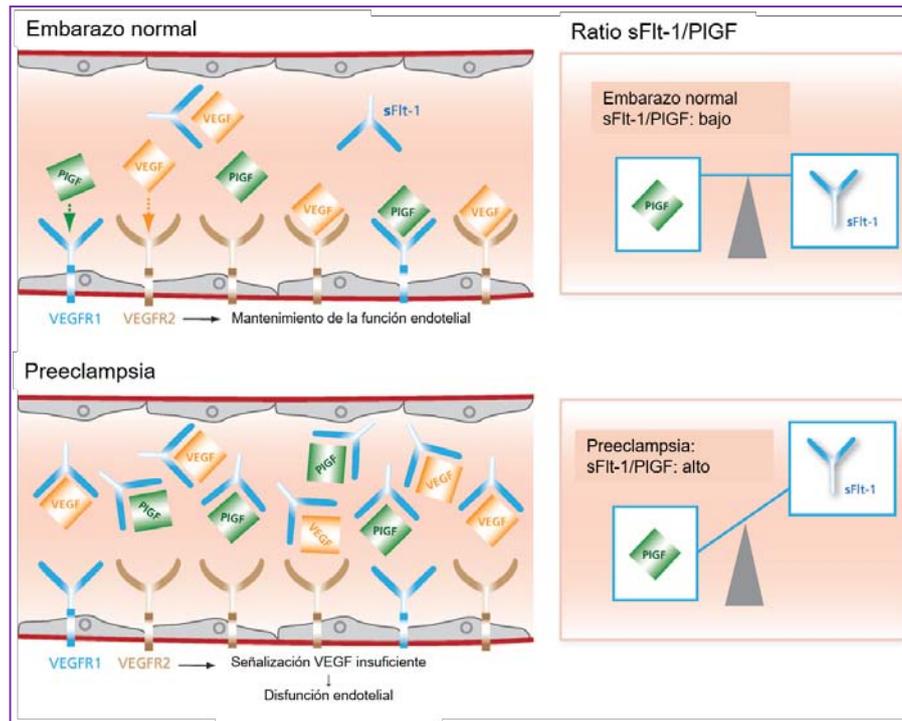


Figura 4. Esquema de la patogénesis de la PE. En el embarazo normal, las concentraciones bajas de sFlt-1 permiten una señalización adecuada de VEGF y PlGF, manteniéndose el fenotipo anticoagulante y vasodilatador del endotelio sano. En la PE, el aumento de la producción y liberación del factor anti-angiogénico sFlt-1 desde la placenta conduce a una disminución de la biodisponibilidad de VEGF y PlGF. Esto produce una alteración del eje de señalización VEGF/PlGF y a una disfunción endotelial generalizada. PlGF, factor de crecimiento placentario; sFlt-1; receptor soluble de tirosín quinasa; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. VEGFR-1, -2, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-1, -2. Modificado de Hagmann et al (34).

Existen otros factores de índole genética e inmunológica implicados en la patogenia de la enfermedad (18), además de los factores de riesgo mencionados. Sin embargo, el fracaso de la transformación fisiológica de las arterias espirales no es específico de la PE, ni causa suficiente por sí mismo para provocarla (37). Dicho fallo existe en otros síndromes obstétricos, entre ellos el CIR (38, 39), el desprendimiento de placenta (40) o la rotura prematura de membranas (41). Por tanto, en el caso de la PE, es necesaria la existencia de otros factores extraplacentarios para desencadenar dicha patología, que no se presentan en el resto de las condiciones mencionadas o no aparecen con tanta severidad. Es el llamado “**modelo en dos pasos**” (18) (figura 5).

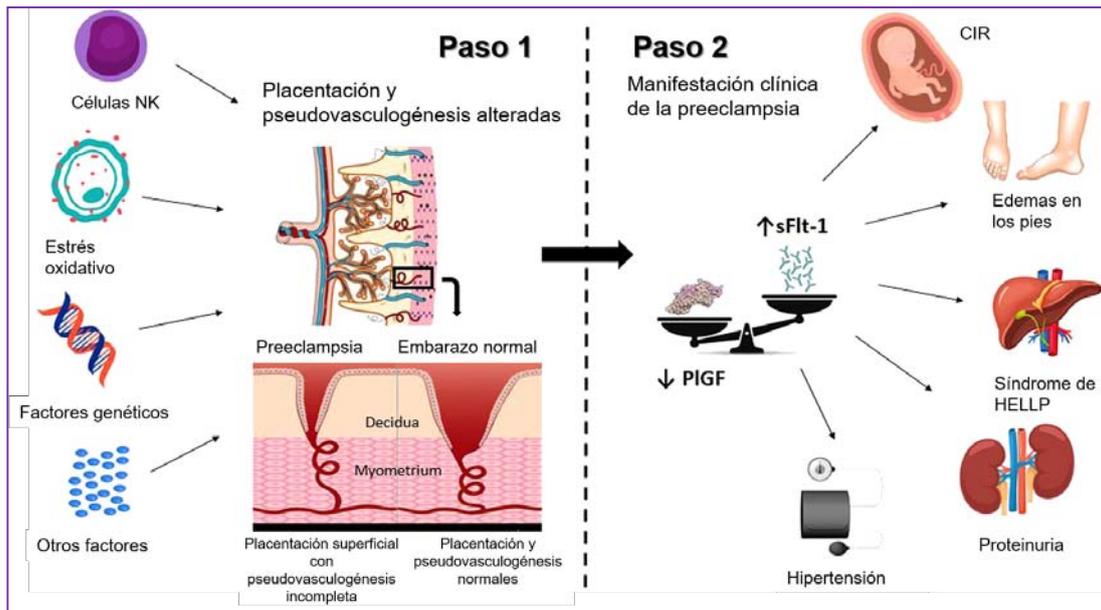


Figura 5. Fisiopatología en dos pasos de la PE. Modificado de Shanmugalingam et al (42).

En un primer paso, la placentación anómala produce una circulación placentaria deficiente e hipoxia. Esta situación hace que posteriormente se produzca un desbalance entre los requerimientos nutricionales del feto y la capacidad placentaria para suministrarlos, liberándose en un segundo paso, durante la segunda mitad de la gestación, distintos factores. Algunos de estos factores son los reguladores del equilibrio angiogénico, los cuales incrementan el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, apareciendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad: cuadro sistémico, microangiopatía generalizada y vasoespasmo. Así, el momento y la extensión de ambos factores (la placentación defectuosa y la demanda fetal de suministro de sangre) serían los determinantes para el desarrollo o no desarrollo de la PE (18).

En todo caso, sigue sin estar claro porqué se desarrolla una u otra enfermedad, pues la PE y el CIR comparten los factores mencionados e incluso el desequilibrio anti-angiogénico. Es posible que sea necesario superar un determinado umbral de desbalance anti-angiogénico para que se desarrolle la PE (43), mientras que grados más leves de insuficiencia placentaria y estado anti-angiogénico podrían dar lugar a formas variables de enfermedad placentaria, dependiendo de la constitución materna. Según algunos autores, la

condición que diferencia ambas patologías es una susceptibilidad materna, un síndrome metabólico presente en la PE, pero ausente en el CIR (6) tal y como muestra la figura 6.

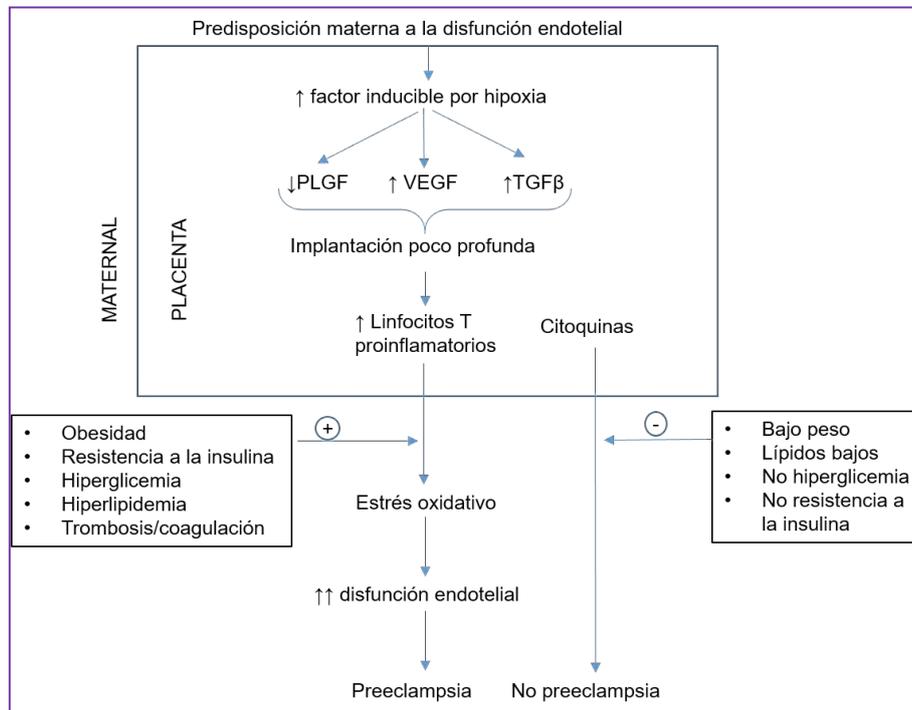


Figura 6. Modelo que sugiere el síndrome metabólico como la clave que diferencia PE y CIR. PIGF, factor de crecimiento placentario; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta. Modificado de Ness et al (6).

Estos factores metabólicos interactúan con la inflamación, alimentando el estrés oxidativo y alterando la función endotelial materna hasta que el proceso cruza un umbral clínico en forma de hipoperfusión de órganos maternos, una característica clínica de la PE, pero no del CIR. Por tanto, el desarrollo de una u otra enfermedad, de forma aislada o concomitante con la otra, dependerá de la existencia o no de este síndrome metabólico materno.

Hoy en día, no se conoce con exactitud la causa de la HTAG. Mientras algunos autores consideran que puede ser una forma leve o incompleta de PE, otros sugieren que se trata de una hipertensión arterial esencial latente desenmascarada precozmente con la gestación. El hecho de que un 17% de las pacientes con HTAG progresen a PE, y que este riesgo de progresión sea mayor cuanto más precoz es la aparición de la HTAG (44), agranda la

controversia en cuanto a si la HTAG es una entidad clínica independiente o, por el contrario, es una forma leve o una presentación temprana de la PE. A pesar de existir algunos factores de riesgo comunes, existen diferencias en la patología placentaria, epidemiología, patogenicidad, características hemodinámicas y biología vascular que parecen confirmar que HTAG y PE son entidades independientes (45).

1.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico tradicional de la PE, basado en la presencia de proteinuria y HTAG, ha dado paso a una definición más flexible donde es posible diagnosticar PE sin la presencia de proteinuria (revisar apartado 1.1 para más detalles). Esto es debido a que la PE puede manifestarse antes de que la endoteliosis capilar glomerular se vuelva lo suficientemente grave como para inducir proteinuria (46). Sin embargo, el diagnóstico de la PE aún se basa en datos clínicos y de laboratorio que son inespecíficos, viéndose dificultado por la presentación clínica variable y/o tardía de algunos casos.

Por el carácter transitorio de la HTAG, ésta ha de ser revaluada mediante la medición de la presión sanguínea aproximadamente tres meses tras el parto. Si la paciente se presenta normotensa, el diagnóstico final es HTAG, mientras que la persistencia de hipertensión es consistente con el diagnóstico de hipertensión crónica (45).

En el caso del CIR, los hallazgos ecográficos, principalmente el peso fetal estimado y la hemodinámica Doppler, aproximan al diagnóstico, pero, frecuentemente, la diferenciación entre CIR y fetos “pequeños para la edad gestacional” es extremadamente difícil, incluso para el personal más especializado (47).

1.1.4.1 Marcadores bioquímicos

Clásicamente, los marcadores utilizados para valorar las gestantes con PE han sido las pruebas de función hepática y el ácido úrico. Respecto a éste

último, se encuentra elevado en mujeres con PE debido a que, por un lado, la enzima que lo produce, la xantina oxidasa, se encuentra aumentada como consecuencia de la isquemia placentaria (48) y, por otro, existe una reducción en la excreción renal de urato como consecuencia de una tasa de filtrado glomerular disminuida, aumentando así su concentración en sangre (49). Por ello, la hiperuricemia es un hallazgo característico en la PE (50) que precede muchas veces a la sintomatología y al inicio del fallo renal, considerándose así un marcador de severidad y estrés oxidativo placentario, pero con una sensibilidad baja. Es además marcador de disfunción renal y correlaciona con la severidad de la endoteliosis glomerular, lesión histológica característica de la PE (51). A pesar de lo mencionado, hoy en día no hay evidencia de que sea un marcador predictivo de la enfermedad y su papel patogénico continúa siendo desconocido.

Por otro lado, debido a que las alteraciones vasculares que acontecen en la PE suponen un estrés a nivel cardíaco (52), se han evaluado marcadores bioquímicos a este respecto. El fragmento N-terminal del propéptido natriurético tipo B (NT-proBNP) es uno de los fragmentos secretados principalmente por el ventrículo cardíaco, y su concentración en suero se correlaciona con el pronóstico de la insuficiencia ventricular, utilizándose en la práctica clínica para evaluar las disfunciones ventriculares y para el diagnóstico de la insuficiencia cardíaca. Existen varios estudios (53, 54) que correlacionan niveles aumentados de este péptido con el desarrollo de PE, y podría ser útil para diferenciar PE de CIR, al encontrarse concentraciones medias significativamente distintas entre ambas patologías (4).

En los últimos años, se han seguido buscando y evaluando distintos marcadores con el objetivo de predecir o diagnosticar precozmente la PE, entre los que podemos mencionar la cistatina C, proteína asociada al embarazo proteína placentaria 13, alfa-1 microglobulina, hemoglobina fetal, etc (55). De entre todos, los más prometedores han sido los relacionados con la angiogénesis: sFlt-1 y PlGF.

El estudio de la evolución de ambos factores a lo largo de embarazos de gestantes normotensas y con PE (56), ha demostrado la existencia de niveles

más bajos de PIGF y más altos de sFlt-1 en gestantes que desarrollan PE y disfunción placentaria respecto a gestantes normotensas. La evolución de la relación sFlt-1/PIGF a lo largo del embarazo, expresada como cociente de sus concentraciones séricas, se muestra en la figura 7.

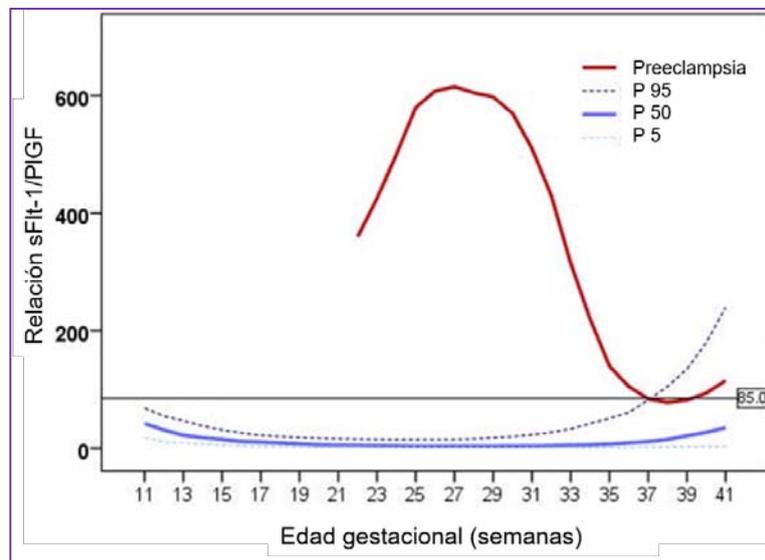


Figura 7. Las concentraciones séricas maternas de la relación sFlt-1/PIGF durante el embarazo. Los valores normales de referencia (los percentiles 5/50/95) se representan en azul (líneas continua y discontinuas) y los valores medios al momento del diagnóstico de PE se representan en rojo oscuro. Las diferencias máximas entre los casos de PE y los embarazos normales se observan durante la fase temprana, especialmente entre las 24 y las 28 semanas de gestación. En la fase tardía, y especialmente en los embarazos a término, se observa una superposición considerable. Para una mejor visualización, el valor de corte de la relación sFlt-1/PIGF de 85 se muestra como una línea horizontal negra. Modificado de Herraiz et al (43).

La relación entre sFlt-1 y PIGF, en combinación con marcadores ecográficos como el índice pulsátil de la arteria uterina, constituye un modelo de predicción de PE temprana que ha mejorado la sensibilidad y especificidad en el 2º trimestre, obteniéndose unos resultados de un 80-100% de sensibilidad y un 89-100% de especificidad para identificar PEP y/o CIR (57-59). Por ello, la relación sFlt-1/PIGF ha sido incorporada en algunos centros a la práctica clínica para ayudar en la predicción, diagnóstico temprano y seguimiento del curso de la enfermedad en la PE (43).

Sin embargo, el uso de los marcadores angiogénicos presenta algunas limitaciones: por un lado, se ha demostrado que tienen una utilidad limitada en

el 1^{er} trimestre (60). Existen estudios con resultados contradictorios respecto a su utilidad (61-63). Por otro lado, no son específicos para la PE, ya que proporcionan información subrogada sobre la función placentaria, la cual está alterada en varias enfermedades de disfunción placentaria, por lo que la relación sFlt-1/PIGF puede aumentar de forma similar en CIR, PE, hemorragia posparto y otros síndromes (9). Así, aunque se ha demostrado que una relación sFlt-1/PIGF ≤ 38 tiene un alto valor predictivo negativo para descartar PE (64), una limitación de esta estrategia de cribado es la alta tasa de falsos positivos. En un estudio publicado recientemente por Sabriá et al (4), el 38.8% de los embarazos con una relación sFlt-1/PIGF > 38 no presentó PE al momento del parto y solo el 26.9% desarrolló esta enfermedad durante la semana posterior al cribado. Además, la relación sFlt-1/PIGF no difirió significativamente entre las pacientes con CIR y aquellas con PE, no existiendo evidencia suficiente para establecer puntos de corte específicos de predicción y diagnóstico del CIR. Por ello, un punto en discusión es si la evaluación de biomarcadores involucrados en una sola vía de la enfermedad (angiogénesis) puede predecir o detectar a todas las mujeres con PE, una enfermedad que tiene una etiología múltiple (65).

1.1.5 Complicaciones maternas y perinatales:

1.1.5.1 Hipertensión gestacional

Como ya se ha mencionado, aproximadamente el 17% de las mujeres con HTAG desarrollarán durante el embarazo PE (44). Las pacientes con HTAG tienen un mayor riesgo de complicaciones obstétricas graves en comparación con las gestantes sin esta patología, pero este riesgo es considerablemente menor que el de las gestantes con otros trastornos hipertensivos del embarazo, como la hipertensión crónica, la PE, o la eclampsia (66). Además, la severidad de la hipertensión es un factor predictor importante, ya que las mujeres con HTAG grave tienen un mayor riesgo de resultados adversos maternos y perinatales que las mujeres con PE leve (21).

1.1.5.2 Preeclampsia

La PE ha sido identificada como la principal causa del ingreso en unidades de cuidados intensivos durante el puerperio (67). La gravedad de las complicaciones maternas y perinatales va a depender de una serie de factores, entre los que se encuentran la edad gestacional al inicio de los síntomas, la severidad de la PE, la calidad en el manejo clínico y la presencia o ausencia de desórdenes médicos preexistentes (68) (tabla 4).

Complicaciones maternas (y su frecuencia estimada):
<ul style="list-style-type: none"> • Desprendimiento de placenta (1-4%) • Coagulopatía diseminada/síndrome de HELLP (10-20%) • Edema/aspiración pulmonar (2-5%) • Insuficiencia renal aguda (1-5%) • Eclampsia (<1%) • Insuficiencia hepática o hemorragia (<1%) • Accidente cerebrovascular (muy rara) • Muerte (muy rara) • Morbilidad cardiovascular a largo plazo
Complicaciones neonatales:
<ul style="list-style-type: none"> • Parto prematuro (15-67%) • Crecimiento intraútero retardado (10-25%) • Lesión neurológica por hipoxia (<1%) • Muerte perinatal (1-2%) • Morbilidad cardiovascular a largo plazo asociada con bajo peso al nacer (origen fetal de la enfermedad del adulto)
<p>La magnitud del riesgo depende de: la edad gestacional en el momento del diagnóstico, el desarrollo del parto, la gravedad de la enfermedad y la presencia de trastornos médicos asociados.</p>

Tabla 4. Complicaciones maternas y fetales en PE severa. HELLP: hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas. Modificado de Sibai et al (68).

En general, los resultados son favorables en los casos de PE leve desarrollada tras la semana 36 de gestación mientras que, en la PEP, la morbilidad y mortalidad materna y perinatal aumenta.

Debe tenerse en cuenta que, aunque hay un riesgo 4 a 6 veces mayor de resultados adversos maternos y perinatales entre los casos de PEP en comparación con los de PET, estos últimos son los más comunes, por lo que en términos absolutos las PET acumulan el mayor número de complicaciones (69).

1.1.5.3 Crecimiento intraútero retardado

Los recién nacidos con CIR son propensos a desarrollar complicaciones después del nacimiento. Algunas de las complicaciones a corto plazo incluyen asfixia perinatal, aspiración de meconio, hipertensión pulmonar persistente, hipotermia, hipo e hiperglucemia, hipocalcemia, policitemia, ictericia, dificultad e intolerancia alimentaria, enterocolitis necrotizante, sepsis de inicio tardío, hemorragia pulmonar, etc. (70). A largo plazo, los principales problemas incluyen un crecimiento físico anormal y alteraciones neuro-conductuales (71).

1.2 Estrés oxidativo

1.2.1 Generalidades

Un radical libre es un átomo, molécula, o compuesto altamente inestable debido a que en su estructura atómica o molecular tiene en su orbital más externo uno o más electrones desapareados (72), y es esta capa de electrones incompleta la que confiere su alta reactividad. Los radicales libres pueden generarse a partir de muchos elementos, pero en los sistemas biológicos los que involucran al oxígeno y al nitrógeno son los más importantes (73).

El oxígeno molecular (O_2) participa en la transferencia de electrones de alta energía ayudando en la generación de grandes cantidades de adenosina-5- trifosfato a través de la fosforilación oxidativa, energía necesaria para múltiples reacciones y funciones celulares (72). En este proceso, el O_2 es reducido totalmente a agua (figura 8), generándose productos intermedios denominados especies reactivas de oxígeno (ERO). Aunque la cadena respiratoria mitocondrial es la mayor fuente de ERO, existen otros muchos sistemas intra- y extracelulares involucrados en la producción constante de ERO (72, 74).

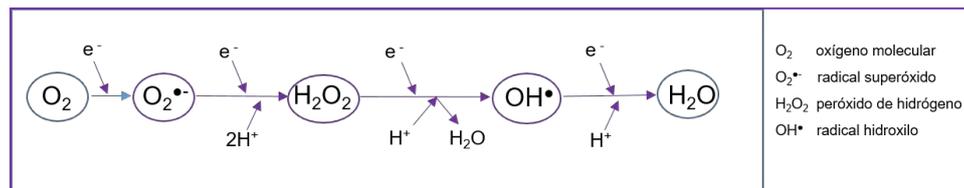


Figura 8. Reducción total del oxígeno molecular. En cuatro pasos, con el aporte seriado de cuatro electrones, el O_2 es totalmente reducido hasta agua, producto final en la cadena de transporte electrónico.

Estas ERO tienen la capacidad de reaccionar muy fácilmente con cualquier sustancia orgánica que se encuentre a su alrededor, siendo capaces de atacar a moléculas biológicas como proteínas, lípidos o cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (73). Este proceso en el que las ERO producen daño biomolecular a los constituyentes de los organismos vivos es conocido como *daño oxidativo* (75).

Cuando las ERO se encuentran cerca de las membranas, atacan a los fosfolípidos de las mismas provocando su oxidación, en un proceso conocido como peroxidación lipídica, y que puede generar una reacción en cadena en la que se producen distintos radicales en un proceso que se amplifica (76). En consecuencia, se forman aldehídos potencialmente tóxicos entre los que destacan el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2(E)-nonenal (77). Estos aldehídos son sustancias estables que pueden atacar dianas moleculares lejanas al lugar donde se originan. Además, provocan que la membrana pierda su integridad (78), por lo que aumenta la filtración a través de ésta de sustancias que normalmente no pueden cruzarla, provocando un mayor daño a la estructura (76), lo que conlleva múltiples desórdenes biológicos.

A pesar de lo mencionado, los radicales libres también cumplen un papel fundamental en procesos fisiológicos, como el control de la tensión arterial, la intervención en funciones endoteliales, señales celulares, apoptosis, división celular y transcripción génica (79). Por ello, son necesarios unos niveles mínimos de ERO para el buen funcionamiento celular, pero sin exceder un determinado umbral que implicaría un desequilibrio entre los procesos involucrados en su producción y eliminación. Para ello, el organismo dispone de un sistema de defensas antioxidantes enzimático y no enzimático que elimina o inactiva a los radicales libres (tabla 5).

Enzimáticos	No enzimáticos	
<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa (SOD) • Catalasa (CAT) • Glutación peroxidasa (GPx) • Glutación reductasa (GR) • Glutación S-transferasa (GST) 	<ul style="list-style-type: none"> • Glutación (GSH) • Albúmina • Coenzima Q • Ceruloplasmina • Lactoferrina • Haptoglobina • Ácido ascórbico • Elementos traza (Cu, Fe, Mn, Se, Zn) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemopexina • β-caroteno • Transferrina • Bilirrubina • Ácido úrico • Glucosa • Vitaminas C, E

Tabla 5. Sistema antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes de naturaleza enzimática necesitan, en general, ayuda de cofactores para realizar sus funciones, como metales (Cu, cobre; Fe, hierro; Mn, manganeso; Se, selenio; Zn,

zinc), mientras que los no enzimáticos suelen provenir de una fuente exógena. Adaptado de Roth et al (81).

El sistema de defensa actúa a dos niveles: o bien impidiendo la formación de ERO, o bien eliminando las ERO ya formadas (80).

Los antioxidantes pueden encontrarse dentro de la célula, en la membrana o fuera de ella (82, 83). Cuando el balance entre los oxidantes y los antioxidantes está desequilibrado a favor de los primeros, se genera una situación perjudicial conocida como **estrés oxidativo**. Este desequilibrio se produce por cambios en alguno de los dos lados de la balanza: bien por un incremento en la generación de ERO, o bien por una disminución del sistema antioxidante (73).

1.2.2 Marcadores de estrés oxidativo

Debido a que el estrés oxidativo es fruto de un desequilibrio del estado natural pro-antioxidativo, es necesario medir ambos lados de la balanza para una correcta valoración. Al existir muchas moléculas que pueden ser analizadas, se han estandarizado unos métodos de detección para cada uno de los procesos implicados en la aparición del daño oxidativo (tabla 6).

Métodos de detección del daño oxidativo		
DIRECTOS	Medida de la formación <i>in vivo</i> de ERO	<ul style="list-style-type: none"> • Resonancia paramagnética nuclear • <i>Spin trapping</i>
INDIRECTOS	Medida de la capacidad antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad antioxidante relativa al trolox • Cantidad de radicales atrapados totales • Capacidad antioxidante de los radicales • Poder reductor antioxidante del hierro
	Medida de los sistemas de defensa	<ul style="list-style-type: none"> • Medida de las defensas enzimáticas: CAT, SOD, GPx, GR • Medida de las defensas no enzimáticas: sistema GSH, vitamina C

	Medida de las consecuencias	<ul style="list-style-type: none"> • Medida del daño oxidativo a lípidos: 4-HNE, MDA, F2-isoprostanos • Medida del daño oxidativo a proteínas: glicosilación proteica, oxidación de aminoácidos, formación de agregados • Medida del daño oxidativo al ADN: 8-OHdG, comet assay o análisis del daño general al ADN
--	-----------------------------	---

Tabla 6. Esquema representativo de los métodos más empleados en la determinación del daño oxidativo. 4-HNE, 4-hidroxi-2(E)-nonenal; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; ADN, ácido desoxirribonucleico; CAT, catalasa; ERO, especies reactivas de oxígeno; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, Glutatión; MDA, malondialdehído; SOD, superóxido dismutasa. Adaptado de Poljsak et al (84).

1.2.3 Estrés oxidativo en el embarazo

La generación de ERO aumenta durante el embarazo, debido fundamentalmente a la alta demanda de oxígeno de la madre y el feto, lo cual aumenta el metabolismo oxidativo (85). Además, hacia el final del 1^{er} trimestre, se termina de conformar la placenta discoide definitiva, proceso en el que el estrés oxidativo juega un papel central, considerándose por tanto fisiológico (73). El inicio de la circulación se asocia con un aumento de tres veces en la concentración de oxígeno dentro de la placenta (86), lo cual incrementa la generación de ERO, particularmente en la capa sincitiotrofoblástica, que contiene bajas concentraciones de las principales defensas enzimáticas antioxidantes, las Cu y Zn-superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (87, 88).

Así, los estudios realizados al respecto muestran niveles de peroxidación lipídica más altos en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas (89-91), observándose un incremento del estrés oxidativo a medida que avanza el embarazo (92-94). Sin embargo, no está tan claro cómo evoluciona la defensa antioxidante a lo largo de la gestación, puesto que aunque algunos estudios parecen haber demostrado un incremento de esta defensa (95, 96), lo cual podría significar una adaptación a la necesidad de cambio para poder mantener el equilibrio pro-antioxidante, en otros estudios

(92, 97) se observa un descenso significativo, sugiriéndose un agotamiento de la defensa ante un mayor daño oxidativo.

1.2.4 Estrés oxidativo y preeclampsia

Como se ha comentado, la generación de ERO ocurre de forma natural en el proceso de implantación, proliferación, diferenciación e invasión trofoblástica de cualquier embarazo, pero en el caso de la PE tiene lugar un desbalance entre la formación de lípidos peróxidos y la actividad antioxidante llevada a cabo por muchas enzimas (98). El incremento de la exposición a ERO puede llevar a la carboxilación de proteínas, peroxidación de lípidos y oxidación del ADN, encontrándose abundante evidencia de estrés oxidativo en la sangre y los tejidos de las mujeres con PE (tabla 7).

Evidencia de estrés oxidativo en la PE	
Marcadores circulantes	Marcadores no lipídicos: <ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos contra LDL • Actividad oxidante del ascorbato • Aumento de nitrosotioles
	Marcadores lipídicos: <ul style="list-style-type: none"> • Productos de oxidación de lípidos • Anticuerpos contra LDL oxidada
En tejidos sistémicos maternos	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de los residuos de nitrotirosina en los vasos sanguíneos • Neutrófilos y monocitos activados
En la decidua	<ul style="list-style-type: none"> • Aterosclerosis con macrófagos cargados de lípidos • Aumento de los peróxidos lipídicos • Aumento de los isoprostanos aumentados • Proteínas carbonil
En la placenta	Marcadores no lipídicos: <ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la xantina oxidasa en las células invasoras del trofoblasto • El aumento de nitrotirosina en los vasos sanguíneos fetales

	Antioxidantes:
	<ul style="list-style-type: none"> • SOD reducida • GPx reducida
	Marcadores lipídicos
	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del MDA • Aumento de peróxidos lipídicos • Proteínas carbonil

Tabla 7. Evidencia de estrés oxidativo en sangre y tejidos de mujeres con PE. GPx, glutatión peroxidasa; LDL, lipoproteína de baja densidad; MDA, malondialdehído; SOD, superóxido dismutasa. Modificado de Roberts et al (99).

En el modelo de los dos pasos (revisar apartado 1.1.3, figura 5, para más detalles), el estrés oxidativo juega un papel relevante en la fisiopatología de la PE, y se ha propuesto como el vínculo entre las dos etapas de la enfermedad (100), ya que se piensa que es el causante de la liberación de factores en la circulación materna que estimulan a su vez la respuesta inflamatoria y la activación de las células endoteliales maternas.

La reducción de la perfusión placentaria debida a la invasión trofoblástica poco profunda crea cambios en el entorno placentario, en donde las ERO y la activación de las células endoteliales, a través de diferentes mecanismos, dan como resultado la disfunción endotelial (101). Debido a la invasión defectuosa del trofoblasto, se produce un flujo sanguíneo arterial intermitente, lo que resulta en periodos de isquemia/reperfusión, creando un entorno hipóxico que favorece el estrés oxidativo, el consiguiente daño oxidativo y la inflamación (102) (figura 9).

La mayoría de estudios realizados al respecto confirman la existencia de mayores niveles de oxidantes y menores de defensa antioxidante en mujeres con PE respecto a embarazadas sanas (50, 91, 103, 104)

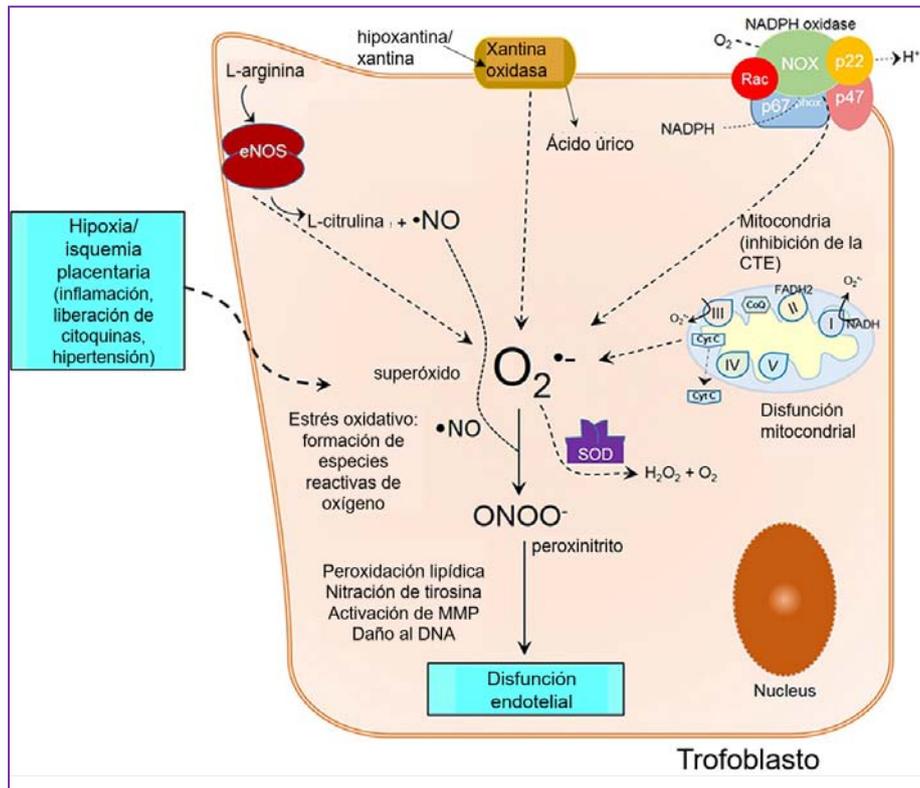


Figura 9. Mecanismos de la disfunción endotelial en la PE. La mala invasión del trofoblasto en la PE causa un deterioro de la remodelación de la arteria espiral, seguida de isquemia/reperfusión placentaria e inflamación. Dentro de la célula trofoblástica, el estrés oxidativo proveniente de la formación desequilibrada de radicales libres se forma a partir de diferentes fuentes como la xantina oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y la mitocondria. En última instancia, todos estos eventos se orquestan conduciendo a la formación de peroxinitrito, peroxidación de lípidos, modificación de proteínas, activación de MMP y daño al ADN, lo que contribuye a la disfunción endotelial. Co Q, coenzima Q; CTE, cadena transportadora de electrones; Cyt C, citocromo C; eNOS, sintasa de óxido nítrico endotelial; FADH₂, flavín adenin dinucleótido, forma reducida; H⁺, catión hidrógeno; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; MMP, metaloproteinasas de la matriz celular; NADH, nicotin adenin dinucleótido, forma reducida; •NO, óxido nítrico; O₂, oxígeno molecular; O₂^{•-}, radical superóxido; ONOO⁻, peroxinitrito; SOD, superóxido dismutasa; I, II, III, IV, V, complejos de la cadena transportadora de electrones. Modificado de Sánchez-Aranguren et al (101).

Al contrario que en la PE, el papel que juega el estrés oxidativo en el CIR apenas ha sido estudiado. La evidencia disponible sugiere que el nivel de estrés oxidativo placentario observado en el CIR es similar al encontrado en embarazos fisiológicos, o algo superior al de estos, pero inferior al encontrado en los embarazos con PEP (105, 106), lo cual sugiere un daño vascular más leve en el caso del CIR (73). Se han encontrado pruebas morfológicas y

moleculares de estrés oxidativo en placentas de gestaciones con CIR, por lo que se especula que, desde el comienzo de la circulación materna, tiene lugar un estrés crónico de bajo nivel que conduce a un menor crecimiento de la placenta (107).

1.3 Elementos traza

1.3.1 Generalidades

Los elementos traza son aquellas moléculas que el ser humano precisa en concentraciones menores a 100 mg/día o que presentan concentraciones en plasma o suero inferiores a 100 µg/ml. Algunos de ellos son considerados esenciales cuando, tal y como está ampliamente aceptado (108), una ingesta deficiente produce de manera consistente un deterioro de una función biológica de óptima a subóptima y cuando la suplementación con niveles fisiológicos de este elemento, pero no de otros, previene o cura esta alteración. Así, dentro de los elementos traza esenciales estarían el cromo, cobre (Cu), cobalto (Co), flúor, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio (Se), vanadio, zinc (Zn), níquel, silicio, arsénico y estaño. Otros elementos considerados candidatos para obtener esta distinción son el bario, el boro, el bromo y el estroncio (Sr) (109).

1.3.2 Papel en el organismo y el embarazo

Las enzimas catalizan reacciones químicas tanto anabólicas como catabólicas, fundamentales en el metabolismo celular. Existe una interacción muy estrecha entre algunas enzimas y algunos elementos traza, pudiendo estar unidos de una forma más laxa (enzima-metal), o firmemente adheridos (metaloenzimas). En cualquiera de los dos grupos, el papel de los elementos traza puede ir desde mantener la conformación estructural de la proteína enzimática, unir el sustrato a la proteína, a intercambiar electrones en las reacciones catalizadas (110). Así, los elementos traza participan en el mantenimiento de procesos bioquímicos, y la alteración de sus niveles puede desregular mecanismos importantes y predisponer a enfermedades (111).

Por su parte, el embarazo es un período de rápido crecimiento y diferenciación celular tanto para la madre como para el feto. En consecuencia, es una etapa durante la cual ambos son vulnerables a los cambios en el suministro dietético, especialmente de aquellos micronutrientes que son marginales en circunstancias normales (112). Como ya se ha comentado, la

generación de ERO ocurre naturalmente durante el transcurso de cualquier embarazo (98), por lo que algunos elementos traza han sido estudiados extensivamente en embarazos normales y complicados debido a su función como cofactores enzimáticos antioxidantes, como es el caso, por ejemplo, del Cu, el Se y el Zn.

El Se es un elemento traza esencial, cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que forma parte del mayor sistema de defensa celular contra el daño oxidativo (113). El requerimiento de Se en mujeres embarazadas y en período de lactancia aumenta como resultado del transporte de Se a través de la placenta y la leche materna, por lo que los niveles en sangre y suero disminuyen durante el embarazo y son más bajos que los observados en mujeres no embarazadas (114).

El Cu es componente de numerosas enzimas y cofactor de la enzima antioxidante SOD (115). Durante el embarazo existe un aumento progresivo del mismo, que parece estar relacionado con una síntesis incrementada de ceruloplasmina, una de las principales proteínas de unión a Cu, como resultado de los niveles elevados de estrógeno materno. Otra razón puede ser la disminución de la excreción biliar de Cu, inducida por cambios hormonales típicos del embarazo (116).

El Zn desempeña un papel importante en la mejora de la salud reproductiva y también se requiere para una función celular óptima, ya que actúa como cofactor de más de 300 enzimas diferentes, como la SOD, anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina o alcohol deshidrogenasa (117, 118). Durante el embarazo, los niveles de Zn circulante están disminuidos y se produce una mayor reducción a medida que avanza el embarazo, posiblemente debida a cambios hormonales y al aumento de la transferencia de la madre al feto (119).

1.3.3 El Estroncio

Considerado actualmente como un elemento traza no esencial, hasta hace unos años apenas se sabía nada de las posibles funciones del Sr en el

cuerpo humano. Sin embargo, en la última década se ha ido incrementando este conocimiento, siendo objeto de numerosos estudios debido a su uso, bajo la forma de ranelato de Sr, en el tratamiento de la osteoporosis. El Sr (peso atómico: 87.62 u) es un catión divalente con similitud química y física con el calcio (Ca), aunque con mayor peso molecular. Ambos cationes compiten por los mecanismos de transporte, al tener vías comunes, teniendo el Sr menor absorción intestinal y mayor aclaramiento renal, debido a una menor reabsorción tubular por su mayor tamaño (120). El Sr ingresa en el cuerpo humano con la alimentación, estando presente en concentraciones traza. Tras la absorción, muestra gran afinidad por el tejido óseo, depositándose el 99% en el tejido mineral y representando el 0.035% del contenido de Ca. Tiene una baja unión a proteínas plasmáticas (25%), no se metaboliza y se elimina lentamente por vía renal y fecal.

La introducción del ranelato de Sr en el tratamiento de la osteoporosis propició el interés por los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa el Sr (121). El ranelato de Sr ha demostrado su eficacia en la prevención de fracturas en pacientes con osteoporosis, induciendo efectos beneficiosos en la masa y resistencia ósea al reducir la resorción y mantener o incrementar la formación del hueso, como indican los resultados de los estudios internacionales STRATOS (STRontium Administration for Treatment of Osteoporosis, administración de Sr para el tratamiento de la osteoporosis) (122) y TROPOS (Treatment Of Postmenopausal OSteoporosis, tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica) (123). El Sr es la única fracción activa del compuesto en el fármaco, dado que el ácido ranélico que lo acompaña es un ácido orgánico capaz de quelar cationes metálicos, carente de actividad biológica, y que se elimina rápida e inalteradamente por vía renal, pero que facilita la absorción y la farmacocinética del Sr. En los últimos años, se generó una gran controversia respecto a su uso, debido a los resultados de varios estudios que determinaron un riesgo incrementado de eventos cardiovasculares y tromboembólicos en los pacientes tratados con este fármaco (124, 125), aunque otros estudios similares concluyeron que no existía evidencia a este respecto (126). Finalmente, en enero del 2014, el comité para la evaluación de riesgos en farmacovigilancia europeo (PRAC) concluyó que

existía un balance beneficio-riesgo desfavorable del uso de este fármaco, recomendando la suspensión de su comercialización (127).

No existen muchas investigaciones que hayan estudiado el papel del Sr en el contexto del embarazo fisiológico, y las que hay no le dan ningún significado concreto a las concentraciones encontradas (128-132).

1.3.4 Papel de algunos elementos traza en la preeclampsia

El papel desempeñado por algunos elementos traza como cofactores de enzimas antioxidantes ha propiciado que hayan sido estudiados en patologías obstétricas donde el estrés oxidativo tiene un papel importante, como la PE (104, 133, 134). Al respecto, los resultados son en general contradictorios, excepto en el caso del Se, en donde sí parece existir acuerdo sobre una situación de deficiencia en aquellos embarazos con resultados adversos (135, 136). De hecho, se han puesto en marcha varios estudios de suplementación con Se para valorar su efecto en la prevención de distintas patologías, con resultados bastante prometedores (137, 138). Por otro lado, cuando se ha encontrado deficiencia de alguno de los otros elementos estudiados, este hecho ha sido sugerido como causa contribuyente al estrés oxidativo, produciendo disfunción endotelial en las mujeres con PE (104, 112). Sin embargo, no se ha podido confirmar con certeza la existencia de una relación entre la deficiencia/exceso de algunos de estos elementos traza y la aparición de la PE.

Si poco se sabía hasta hace unos años sobre el posible papel biológico del Sr, mucho más incierto es si juega algún papel de relevancia en las patologías del embarazo. La única referencia que se tiene es un trabajo publicado en 2015 (139), cuyos resultados revelaron concentraciones de Sr significativamente mayores en gestantes con PE frente a embarazos sanas, observándose además una correlación positiva con el factor anti-angiogénico sEng (figura 10). Sin embargo, este estudio presentaba varias limitaciones: el tamaño muestral de gestantes con PE fue bastante limitado (n=37), no se

estableció distinción entre PEP y PET, ni del grado de severidad, y el intervalo gestacional estudiado fue muy amplio (semanas 27 a 39).

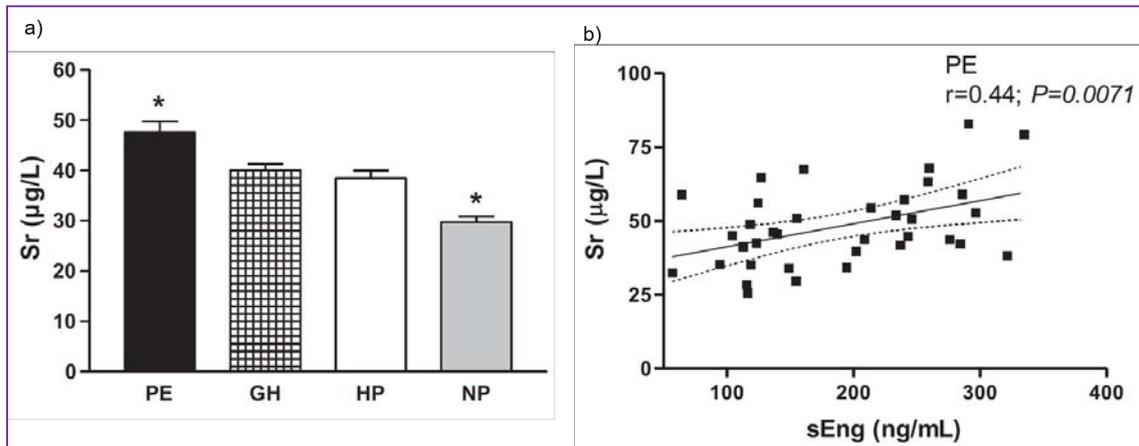


Figura 10. Resultados más relevantes del estudio “Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy”, de Rezende et al (139). a) Niveles plasmáticos de Sr encontrados en mujeres con preeclampsia (PE), hipertensión gestacional (GH), embarazos sanos (HP) y mujeres no embarazadas (NP). * $P < 0.05$ frente al grupo HP. b) Correlación positiva entre los niveles plasmáticos de sEng, factor anti-angiogénico, y Sr en mujeres con PE.

2. Justificación e Hipótesis

2. Justificación e Hipótesis

Justificación

A pesar de haberse avanzado notablemente en el entendimiento de la PE y otras patologías obstétricas relacionadas con ésta, aún no se comprenden todos los mecanismos fisiopatológicos implicados, y su diagnóstico continúa siendo un desafío para los clínicos. Los marcadores angiogénicos utilizados en la práctica clínica presentan limitaciones, pues no son más que un reflejo de la disfunción placentaria existente y no permiten distinguir claramente los casos de PE de otras patologías placentarias. Los criterios diagnósticos de estas enfermedades, más que basarse en su origen patogénico, aún se apoyan en hallazgos inespecíficos tanto clínicos, ecográficos, como de laboratorio, los cuales apenas han sido modificados en los últimos años.

El uso de nuevos marcadores que ayuden en el diagnóstico precoz de la PE y del resto de las patologías placentarias podría suponer una mejora significativa de los resultados de atención sanitaria en este tipo de gestaciones. A este respecto, el grupo del Dr. Álvarez lleva investigando en el campo de la PE desde el año 2012, y fruto de ello son los distintos artículos publicados desde entonces (4, 140-143). En esta búsqueda, se ha centrado la atención en un elemento, el Sr, por varios motivos. Por un lado, se conoce muy poco de las funciones biológicas de este elemento y de su posible papel en el embarazo, existiendo con anterioridad al desarrollo de esta tesis doctoral un único estudio donde se hubiera evaluado el Sr en gestantes con PE e HTAG (139). Este mismo estudio, aunque con limitaciones importantes de diseño, permitió obtener unos resultados alentadores en cuanto a la posible relación de las concentraciones séricas de Sr y el desarrollo de PE. Además, el Sr ha sido relacionado con un mayor riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares y tromboembólicos en pacientes tratados con ranelato de Sr (124, 125). Dado que la PE se configura como una disfunción endotelial con una disminución del gasto cardíaco, podría existir una relación de causa-efecto entre los niveles de Sr y el desarrollo de PE. Por último, el hecho de que no exista una variación dietética en la ingesta de Sr durante el embarazo, al no ser un elemento objeto

de suplementación, representa una ventaja frente al estudio de otros elementos traza.

Hipótesis

Existen indicios de que las concentraciones séricas de Sr puedan estar alteradas en la PE, y de que este elemento esté involucrado en la fisiopatología de la enfermedad. Por ello, su determinación tanto en gestaciones sanas como en gestaciones con PE u otras patologías obstétricas sería útil para evaluar su potencial como biomarcador de PE, así como estimar el papel que este elemento pueda desempeñar en esta patología.

3. Objetivos

3. Objetivos

1. Determinar cómo evolucionan los niveles séricos de Sr a lo largo del embarazo y compararlos con los de otros elementos traza.

Análisis de las concentraciones séricas del Sr y otros elementos traza (Cu, Se y Zn) en mujeres no embarazadas, durante el embarazo fisiológico (1^{er}, 2^o y 3^{er} trimestres de gestación) y el posparto inmediato.

2. Estudiar la posible utilidad del Sr como biomarcador de PE.

Análisis de las concentraciones séricas de Sr en gestantes con PEP y PET en distintos momentos del embarazo y de la enfermedad:

- a) al principio y al final de la gestación, comparándolas con las halladas en gestantes sanas y con HTAG.
- b) antes y en el momento de inicio de los síntomas, comparando dichas concentraciones con las halladas en gestantes con CIR e HTAG.

3. Determinar el rendimiento diagnóstico del Sr en los distintos momentos evaluados, así como su posible relación con la severidad de la enfermedad y su capacidad predictora de necesidad de finalizar el embarazo debido a enfermedad.

Análisis estadístico mediante el uso de curvas ROC (receiver operating characteristics, características operativas del receptor), regresiones lineales simples y el grado de asociación mediante coeficientes de correlación de Pearson y Spearman.

4. Buscar puntos de unión entre el Sr y otros parámetros bioquímicos relacionados con la PE, para esclarecer el papel del Sr en la enfermedad.

Análisis del estrés oxidativo, niveles de Ca, ácido úrico, NT-proBNP, factores angiogénicos y función renal, tanto en gestantes sanas como en gestantes con PE, CIR y HTAG, con análisis estadístico posterior.

4. Resultados

4. Resultados

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones, las cuales figuran a continuación. Se trata de tres comunicaciones científicas que fueron aceptadas como artículos originales para publicación entre el 22 de septiembre de 2017 y el 1 de mayo de 2019.

El orden cronológico de publicación de dichos trabajos se corresponde con el orden natural y lógico del estudio.

4.1 Estroncio y estrés oxidativo en el embarazo normal

Artículo 1: Clara Barneo-Caragol, Eduardo Martínez-Morillo, Susana Rodríguez-González, Paloma Lequerica-Fernández, Ignacio Vega-Naredo, Francisco V. Álvarez. "Strontium and oxidative stress in normal pregnancy".

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 45 (2018) 57–63

Doi: 10.1016/j.jtemb.2017.09.021

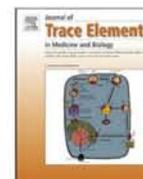
JCR Impact Factor: 3.755; Rank: 88/293; Quartile: Q2

Publicado en enero del 2018, se planteó como estudio inicial para conocer la evolución de los niveles séricos de Sr, y compararla con la de otros elementos traza más conocidos, así como del estrés oxidativo, a lo largo de un embarazo normal en el 1^{er}, 2^o y 3^{er} trimestres de gestación, en grupos independientes y en un grupo de 20 gestantes seriadas. Para disponer de una visión más completa, se evaluaron además otros dos grupos: un grupo de mujeres no embarazadas, sanas y en edad fértil, y un grupo posparto. Otros parámetros como el Ca y el ácido úrico fueron añadidos al estudio para establecer su posible relación con el Sr.

Contribución personal al trabajo:

- Comunicación del estudio al personal colaborador, elaboración de consentimiento informado y distribución de éste en distintos puntos de extracción, para la puesta en marcha del reclutamiento de mujeres sanas no embarazadas, gestantes en el 2^o y 3^{er} trimestres de embarazo y grupo posparto. Solicitud de aprobación del estudio al Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias.
- Conformación de la seroteca con las muestras de la población de estudio (mujeres no embarazadas, embarazadas sanas en el 2^o y 3^{er} trimestres de gestación y grupo posparto). Selección de participantes en base a no cumplimiento de criterios de exclusión (desarrollo de patología durante el embarazo, menores de edad o información incompleta), y recuperación de

- las muestras de la seroteca conformada para el estudio, así como de la seroteca, ya conformada previamente, del programa autonómico de cribado combinado del 1^{er} trimestre para la detección de aneuploidías fetales.
- Análisis de los parámetros bioquímicos seleccionados, para lo cual:
 - Iniciación en el manejo de un equipo de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para el análisis de Sr, Cu, Se y Zn, bajo la supervisión del Dr. Martínez Morillo: aprendizaje de la tecnología utilizada, preparación de calibradores a partir de soluciones patrón primarias, en condiciones metrológicas adecuadas, pool de muestras, soluciones de trabajo, etc.
 - Manejo de equipos automatizados para el análisis del Ca y ácido úrico en las muestras con volumen suficiente, supervisando que las condiciones de trabajo fueran las adecuadas (volumen de muestra, cantidad de reactivo, así como calibración y controles correctos de cada parámetro).
- Establecimiento de un acuerdo de colaboración entre el laboratorio de Bioquímica del HUCA y el laboratorio del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo al inicio del primer trabajo, que se mantuvo durante el resto de trabajos presentados en esta tesis. Este acuerdo permitió la medición de parámetros de estrés oxidativo en las muestras de una parte de la población de estudio, seleccionadas al azar y transportadas por la doctoranda. Además, se mantuvo una comunicación e intercambio de ideas constante respecto a los análisis e interpretación de resultados del estrés oxidativo.
- Manejo de base de datos y revisión de historias clínicas de la población estudiada. Análisis estadísticos, elaboración de tablas y figuras y redacción del manuscrito bajo la supervisión del Dr. Martínez Morillo y del Dr. Álvarez.



Biochemistry

Strontium and oxidative stress in normal pregnancy

Clara Barneo-Caragol^{a,*}, Eduardo Martínez-Morillo^a, Susana Rodríguez-González^b,
Paloma Lequerica-Fernández^a, Ignacio Vega-Naredo^b, Francisco V. Álvarez Menéndez^{a,c}

^a Laboratory of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Av. de Roma, s/n, 33011, Oviedo, Asturias, Spain

^b Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Av. Julián Clavería, s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, C/Fernando Bongera s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Strontium

Trace elements

Oxidative stress

Inductively coupled plasma-mass spectrometry

ABSTRACT

Background: Pregnancy brings about metabolic and oxidative changes that involve various trace elements and oxidative stress. Strontium (Sr) is a trace element scarcely studied in this context, although it has been suggested that it may play a role in the pathophysiology of preeclampsia. The main aim of this study was to evaluate Sr concentrations and oxidative status in normal pregnancy.

Methods: The study population included non-pregnant women (n = 31), healthy pregnant women in the first (n = 50), second (n = 51) and third (n = 53) trimesters of gestation, and women in postpartum period (n = 31). Additionally, samples from another twenty pregnant women were obtained in the three trimesters. Strontium, copper, selenium and zinc were measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Calcium (Ca), uric acid (UA), lipid peroxidation and total antioxidant activity (TAA) were measured by spectrophotometric assays.

Results: Strontium remained unchanged until the third trimester of pregnancy, in which significantly higher levels were found (p = 0.001). The other elements showed diverse trends during pregnancy. Uric acid levels were significantly different in all groups (p < 0.001), increasing gradually as the pregnancy progresses. In serial samples, there was a statistically significant positive correlation between Sr and gestational week of sampling (r = 0.31, p = 0.01), UA (r = 0.40, p = 0.001) and lipid peroxidation/TAA ratio (r = 0.38, p = 0.0002). Additionally, Sr correlated negatively with TAA (r = -0.40, p = 0.0001).

Conclusion: Strontium seems to play a physiological role in the oxidative status of the human organism. Further studies involving Sr and pathologies of pregnancy are warranted.

1. Introduction

Pregnancy is a period of rapid growth and cell differentiation for both the mother and the fetus, which are vulnerable to changes in dietary supply, especially of those micronutrients that are marginal under normal circumstances [1]. Generation of reactive oxygen species (ROS) naturally occurs in the process of implantation, proliferation, differentiation and trophoblastic invasion of any pregnancy [2]. Some trace elements, such as copper (Cu), selenium (Se) and zinc (Zn), have been extensively studied both in normal and complicated pregnancies due to their function as cofactors for antioxidant enzymes, and it has been suggested that they could be implicated in adverse pregnancy outcomes [3–7]. Oxidative stress in pregnancy has also been studied by

measuring indicators of the antioxidant system, the concentrations of end-products derived from oxidative stress, or both [8–13].

Recently, strontium (Sr) has been implicated in the pathophysiology of preeclampsia (PE) [14]. Considered as a non-essential trace element, Sr's function in the human body is barely known, especially its antioxidant and pro-oxidant functions. Strontium is a divalent cation with chemical and physical similarities to calcium (Ca). Although both compete for common carrier proteins, Sr has lower intestinal absorption and higher renal clearance. It shows great affinity with bone tissue, with 99% depositing in the mineral tissue, but only representing 0.04% of the Ca content [15].

The aims of this study were: i) to establish the normal levels of Sr in both non-pregnant and healthy pregnant women at the first, second and

Abbreviations: 1TG, 1st trimester group; 2TG, 2nd trimester group; 3TG, 3rd trimester group; 1Tss, 1st trimester of serial samples; 2Tss, 2nd trimester of serial samples; 3Tss, 3rd trimester of serial samples; Ca, calcium; Cu, copper; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectrometry; MDA, malondialdehyde; NPG, non-pregnant group; PE, preeclampsia; PPG, postpartum group; ROS, reactive oxygen species; Se, selenium; Sr, strontium; TAA, total antioxidant activity; UA, uric acid; Zn, zinc

* Corresponding author at: Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain.

E-mail addresses: cbarneo@hotmail.com (C. Barneo-Caragol), edumartinezmorillo@gmail.com (E. Martínez-Morillo), rodriguezgsusana@gmail.com (S. Rodríguez-González), palomalequerica@gmail.com (P. Lequerica-Fernández), vegaignacio@uniovi.es (I. Vega-Naredo), falvarezmen@gmail.com (F.V. Álvarez Menéndez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.021>

Received 2 March 2017; Received in revised form 16 September 2017; Accepted 22 September 2017
0946-672X/ © 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

third trimesters of pregnancy; ii) to determine the concentrations of other elements (Ca, uric acid (UA), Cu, Se and Zn) and compare their levels with the concentrations of Sr; iii) to evaluate the redox status in a subset of participants by measuring total antioxidant activity (TAA) and lipid peroxidation and evaluate its association with Sr and UA concentrations.

2. Material and methods

2.1. Study population

A total of 236 participants were enrolled in the study between August 2015 and June 2016. Serum samples were collected at Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) and analyzed at the Laboratory of Medicine (HUCA). The study population was divided into three groups: non-pregnant women of childbearing age (NPG, $n = 31$), pregnant women ($n = 174$) and postpartum women (PPG, $n = 31$). Pregnant women were subdivided into two additional subsets of samples: independent groups pregnant women with serum samples collected in the 1st (1TG, $n = 50$), 2nd (2TG, $n = 51$) and 3rd (3TG, $n = 53$) trimesters and a serial samples group, formed by 20 pregnant women whose samples were collected throughout the pregnancy in the three trimesters (1st, 2nd, and 3rd trimesters, 1Tss, 2Tss, and 3Tss, respectively). Serum samples collected at the 1st trimester of pregnancy were available from a Biobank composed of specimens used in HUCA's First Trimester Combined Screening for Fetal Aneuploidies. Samples from the PPG were collected on the first day post-delivery. Clinical data from all participants, including maternal age, type of delivery and complications through the pregnancy, were collected from their medical records by using the software products Cerner Millennium[®] and GestLab[®]. The study population is shown in Fig. 1.

2.2. Exclusion criteria

Participants who developed a pathology during pregnancy (late-onset PE ($n = 1$), intrauterine growth restriction ($n = 1$) and gestational hypertension ($n = 3$)) were excluded from the study. In addition, participants with missing information ($n = 4$) or younger than 18 years old ($n = 3$) were also excluded.

2.3. Collection of serum samples

Samples from all participants were collected in BD Vacutainer[®] red top tubes with no additives. Serum was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. First trimester samples were recovered from the Biobank previously mentioned. Samples from the 2nd and 3rd trimesters were collected after the routine laboratory tests were performed at HUCA's Biochemistry Laboratory. Samples from NPG and

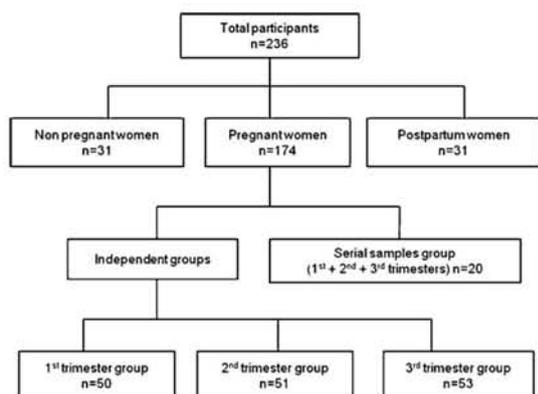


Fig. 1. Study population.

PPG were specifically collected for this study from healthy volunteers. All the samples were stored at -40 °C until assayed.

In all these samples, Sr, Ca and UA were measured. Copper, Se and Zn were determined in the serial samples. A total of 90 serum samples from the different groups (25 from NPG, 40 from serial samples group and 25 from PPG) were randomly selected to evaluate redox status by measuring lipid peroxidation and TAA at the Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo.

2.4. ICP-MS method and sample preparation

An alkaline working solution with 1% ammonium hydroxide, 0.05% EDTA, 0.05% Triton X-100, 4% butan-1-ol and 20 mg/L of internal standards (^{45}Sc , ^{72}Ge , ^{103}Rh , ^{193}Ir and ^{209}Bi) was first prepared. For Sr, a specific calibrator in 2% nitric acid was prepared from a solution containing 1000 mg/L of Sr (High-Purity[™] Standards, accredited by the IDO/IEC 17025, Guide 34). A pool of serum samples from several participants was first prepared, aliquoted and frozen to be used later as internal quality control for Sr, establishing its mean value by a standard additions experiment. For Cu, Se and Zn, a multi-element calibration standard in 2% nitric acid was prepared from mono-element solutions containing 1000 mg/L of each trace element (High-Purity[™] Standards). The limits of quantification and calibration ranges (6-point calibration) were: 3.25 (0–60) $\mu\text{g/L}$ for Sr, 150 (0–3000), 100 (0–2000), and 15 (0–300) ng/mL for Cu, Zn and Se, respectively. Calibrators, pool, quality control (Clinchek[™]) for Cu, Zn and Se and serum samples (200 μL) were diluted by 1:20 with the working solution before analysis. Integration times were 2, 0.5, 1.0, 0.5 and 0.5 s for ^{88}Sr , ^{72}Ge , ^{78}Se , ^{63}Cu , and ^{66}Zn , respectively, and 0.3 s for each internal standard. Measurements were performed in triplicate using an ICP-MS 7700x from Agilent Technologies[®] and total analysis time was less than three minutes per sample. Precision, accuracy and total error were estimated with the internal quality controls by following CLSI guidelines EP15-A2 [16]. Samples with results above the calibration range were diluted with the alkaline solution (without internal standards) and no values below the calibration range were found.

2.5. Spectrophotometry and electrochemiluminescence immunoassay methods

Calcium and UA levels were determined on the automated auto-analyzer Cobas c601 (Roche Diagnostics, Germany) by a spectrophotometric assay (Elecsys[®]). The measuring intervals were 0.2–5 mmol/L, and 0.2–25 mg/dL for Ca and UA, respectively.

2.6. Redox status determination

The lipid peroxidation was used as an indicator of oxidative damage. This process leads to the production of lipid peroxides and its derivative end-products malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) that provide a convenient rate of lipid peroxidation [17]. MDA and 4-HNE content was determined using the 1-methyl-2-phenylindole method, based on the condensation of the chromogenic agent 1-methyl-2-phenylindole with either MDA or 4-HNE [18]. The results are expressed as nmol MDA + 4-HNE/g protein.

The total antioxidant activity was determined using the ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) cation radical method [19] modified for blood samples [20]. Results are expressed in equivalents of mg Trolox/g protein.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with MedCalc[®] 12.5.0. Continuous variables were expressed as means and standard deviations whereas discrete variables were expressed as numbers or percentages.

Normal distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. When the data did not follow a normal distribution (even using the logarithmic transformation), the variables were expressed as median and interquartile range. Analysis of variance or repeated measures analysis of variance tests were used to compare various groups with independent or paired samples, respectively. Student's *t*-tests were used for comparison between two groups of independent and paired samples. The Welch test was used for independent samples with unequal variances. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used when any group compared did not follow a normal distribution. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Associations between variables were assessed using the Pearson product-moment correlation coefficient or the Spearman's rank correlation coefficient when any variable did not follow a normal distribution.

2.8. Ethics

Ethics approval was obtained from the institutional review board. The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct in research involving human subjects. Informed consent was obtained from all participants.

3. Results and discussion

3.1. Analytical characteristics of the ICP-MS method

The mean Sr level obtained in the pool of serum samples used as internal quality control was 33.2 µg/L (Fig. S1, Supplementary data). Imprecision, bias and total error were: 4.3, -0.2, and 7.2%, respectively (estimated with the internal quality control by following the CLSI guidelines EP15-A2 [16]).

3.2. Study population

A total of 236 healthy women aged from 19 to 47 years were included in the study, with an average age of 32.1 ± 5.1 years. There were no significant differences among groups. Mean gestational weeks at the time of extraction were 10.9 ± 0.8, 25.4 ± 1.4 and 36.9 (36.4–37.9) in the 1st, 2nd and 3rd trimesters, respectively, and the mean gestational week at the time of delivery was 40.1 (39.3–40.9). The PPG included 31 healthy women whose serum sample was collected 1.4 ± 1.1 days after delivery. Clinical data, including maternal age, gestational week of sampling and type of delivery, are contained in Table 1.

Table 1
Clinical characteristics of the study population (mean ± SD).

	NPG (n = 31)	1TG (n = 50)	2TG (n = 51)	3TG (n = 53)	PPG (n = 31)	SSG (n = 20)
Participant age (years)	32.4 ± 6.9	32.4 ± 5.1	32.2 ± 4.6	31.9 ± 4.6	31.1 ± 5.6	32.3 ± 4
Gestational week of delivery	–	40.3 ± 1.3	39.6 ± 1.3	40.3 ± 1.2	40.0 (39.3–40.6)	40.1 ± 1.1
Gestational week of extraction	–	10.9 ± 0.9	25.0 (24.6–25.7)	36.7 (36.3–37.6)	–	1Tss 10.9 ± 0.6 2Tss 25.6 ± 0.9 3Tss 37.7 ± 0.9
Time between extraction and delivery date (days)	–	206.0 ± 9.9	99.7 ± 15.4	22.4 ± 10.6	0.98 (0.98–0.98)	204.2 ± 9 100.9 ± 10.8 16.2 ± 7.6
Type of delivery:						
• Spontaneous	–	33 (66%)	30 (59%)	27 (51%)	17 (54.8%)	12 (60%)
• Instrumental	–	13 (26%)	15 (29%)	20 (38%)	9 (29%)	5 (25%)
• Caesarean	–	3 (6%)	6 (12%)	6 (11%)	5 (16.1%)	2 (10%)
• No data	–	1 (2%)	–	–	–	1 (5%)

NPG, non-pregnant group; 1TG, 2TG and 3TG, first, second and third trimester groups respectively; PPG, postpartum group; SSG, serial samples group; 1Tss, 2Tss and 3Tss, first, second and third trimester in serial samples group. Variables that do not follow a normal distribution are expressed as median and interquartile range.

3.3. Serum strontium concentrations

Strontium concentrations were measured from all participants. Mean Sr level in NPG was 26.8 ± 7.1 µg/L and no significant differences were found between this group and the 1TG (28.1 ± 9.9 µg/L), 2TG (27.4 ± 7.8 µg/L) and PPG (32.0 ± 8.2 µg/L). However, Sr levels in the 3TG were significantly higher (33.5 ± 9.9 µg/L, *p* = 0.001), (Table 2). In line with previous results, Sr concentrations in serial samples were similar in the 1Tss and 2Tss (23.8 ± 6.5 vs 22.8 ± 5.6 µg/L, *p* = 0.49, respectively), but significantly lower than in the 3Tss (29.8 ± 8 µg/L, *p* < 0.001), (Table 3). There was a statistically significant positive correlation in serial samples between Sr and the gestational week of sampling (*r* = 0.31, *p* = 0.01).

3.4. Serum uric acid concentrations

Uric acid concentrations could not be obtained from nine samples of 2TG because of insufficient serum. As is shown in Table 2, although UA levels were within the established reference range for the general population, there were significant differences between all groups (*p* < 0.001). In 1TG, UA levels fall significantly compared to NPG (2.8 ± 0.6 vs 3.5 ± 0.8 mg/dL, *p* < 0.0001), but it increased gradually as the pregnancy progressed. The ascendant trend was confirmed in the serial samples, showing a correlation coefficient with the gestational week of extraction of 0.51 (*p* < 0.0001), (Table 3).

3.5. Serum calcium concentrations

Concentration of serum Ca could not be measured in eight samples from 2TG, where the remaining serum volume was insufficient for analysis. Calcium levels were significantly higher in NPG compared to the other groups (2.38 ± 0.08 mmol/L, *p* < 0.0001), while the lowest concentrations were found in PPG (2.18 ± 0.09 mmol/L). During pregnancy, Ca was lower in 2TG (2.24 (2.18–2.27 mmol/L)), with similar concentrations occurring in 1TG and 3TG (2.26 ± 0.15 and 2.29 ± 0.10 mmol/L respectively, *p* = 0.30), (Table 2). In serial samples, the lowest concentration was also found in the 2Tss (2.23 ± 0.05 mmol/L), finding however a downward kinetic (*r* = -0.36, *p* = 0.005), (Table 3).

3.6. Serum copper, selenium and zinc concentrations in serial samples group

Copper concentrations increased according to gestational age (*r* = 0.56, *p* < 0.0001), rising significantly from 1Tss to 2Tss (203.7 ± 46.7 vs 269.9 ± 38.4 µg/dL, *p* < 0.0001) and remaining stable in the 3Tss (269.9 ± 38.4 vs 274.4 ± 47 µg/dL, *p* = 0.40), (Table 3). Selenium levels decreased according to gestational week of extraction (*r* = -0.39, *p* = 0.002), falling significantly from the 2Tss

Table 2
Strontium, calcium and uric acid serum concentrations in independent groups (mean ± SD).

Parameters (reference interval)	NPG		1TG		2TG		3TG		PPG	
Strontium (21.0–100 µg/L) [23]	26.8 ± 7.1 ^a n = 31		28.1 ± 9.9 ^a n = 50		27.4 ± 7.8 ^a n = 51		33.5 ± 9.9 ^b n = 53		32.0 ± 8.2 ^{a,b} n = 31	
Uric acid (2.4–5.7 mg/dL) [24]	3.5 ± 0.8 ^a n = 31		2.8 ± 0.6 ^b n = 50		3.2 ± 0.7 ^c n = 42		4.0 ± 0.8 ^d n = 53		4.8 ± 1.0 ^e n = 31	
Calcium (2.15–2.50 mmol/L) [25]	2.38 ± 0.08 ^a n = 31		2.26 ± 0.15 ^b n = 50		2.24 (2.18–2.27) ^c n = 43		2.29 ± 0.10 ^b n = 53		2.18 ± 0.09 ^c n = 31	
P values	NPG vs				1TG vs			2TG vs		3TG vs
	1TG	2TG	3TG	PPG	2TG	3TG	PPG	3TG	PPG	PPG
Strontium	ns	ns	**	**	ns	**	ns	***	*	ns
Uric acid	****	*	*	****	**	****	****	****	****	****
Calcium	****	****	****	****	*	ns	**	**	*	****

NPG, non-pregnant group; 1TG, 2TG and 3TG, first, second and third trimester groups respectively; PPG, postpartum group. Values in parentheses are reference intervals established in our laboratory/by other studies. Variables that do not follow normal distribution are expressed as median (interquartile range). ^{a,b,c,d,e} Similar alphabets in a row do not differ significantly at $p \geq 0.05$. Variables strontium, uric acid and calcium had $p = 0.001$, < 0.001 and < 0.0001 respectively (analysis of variance/Kruskal-Wallis tests). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = non-significant, p values based on Student's t -test or the Mann-Whitney test.

Table 3
Concentrations of serum elements measured in serial samples of 20 pregnant women at different stages of pregnancy (mean ± SD).

Parameters (reference interval)	1Tss	2Tss	3Tss	P values		
				1Tss/2Tss	1Tss/3Tss	2Tss/3Tss
Strontium (21.0–100.8 µg/L) [21]	23.8 ± 6.5 ^a	22.8 ± 5.6 ^a	29.8 ± 8 ^b	ns	**	****
Uric acid (2.4–5.7 mg/dL) [51]	3.0 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.5 ^b	ns	****	****
Calcium (2.15–2.50 mmol/L) [52]	2.33 ± 0.08 ^a	2.23 ± 0.05 ^b	2.25 ± 0.07 ^b	****	***	ns
Copper (117–301 µg/dL in pregnant at term) [53]	204 ± 46.7 ^a	270 ± 38.4 ^b	274 ± 47.0 ^b	****	****	ns
Selenium (70–150 µg/L) [53]	77.7 ± 9.2 ^a	74.2 ± 6.7 ^a	67.2 ± 8.4 ^b	ns	***	**
Zinc (66–110 µg/dL) [53]	92.7 ± 17.8 ^a	63.6 ± 8.7 ^b	89.4 ± 17.8 ^a	****	ns	****

1Tss, 2Tss and 3Tss, first, second and third trimester in serial samples group. Values in parentheses are reference intervals established in our laboratory/by other studies. ^{a,b,c} Similar alphabets in a row do not differ significantly at $p \geq 0.05$. All variables had $p < 0.001$ (repeated measures analysis of variance). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = non-significant, p values based on paired samples Student's t -test.

to the 3Tss (74.2 ± 6.7 vs 67.2 ± 8.4 µg/L, $p = 0.001$). Zinc levels decreased significantly from the 1Tss to the 2Tss (92.7 ± 17.8 vs 63.6 ± 8.7 µg/dL, $p < 0.0001$), rising significantly in the 3Tss (63.6 ± 8.7 vs 89.4 ± 17.8 µg/dL, $p < 0.0001$) and reaching similar concentrations to the first trimester, with no correlation with the gestational week of sampling ($r = -0.10$, $p = 0.46$)

3.7. Correlations between analytes in serial samples

In serial samples, the only element that correlated significantly with Sr was the UA, showing a strong positive correlation between them ($r = 0.40$, $p = 0.001$).

3.8. Oxidative stress status

Lipid peroxidation in 1Tss was higher than in NPG (75.4 ± 26.7 vs 65.7 ± 35.9 nmol MDA + 4HNE/g prot, respectively), increasing significantly from 1Tss to 3Tss (75.4 ± 26.7 vs 99.3 ± 36, $p = 0.007$) and declining, although not significantly so, in PPG (87.7 ± 42.3, $p = 0.34$), (Table 4). TAA was significantly higher in 1Tss compared to NPG (5.65 ± 2.64 vs 3.76 ± 1.72 mg Tx/g prot, $p = 0.009$), followed by a decreasing trend in 3Tss (3.19 ± 1.02) and postpartum (2.19 ± 0.95) (Fig. 2a). The correlation between TAA and gestational age was $r = -0.64$, $p < 0.0001$. When calculating the lipid peroxidation/TAA ratio, an increasing trend was observed throughout the pregnancy ($r = 0.47$, $p = 0.002$), reaching the maximum value in PPG (Fig. 2b).

When correlations between oxidative stress parameters and Sr/UA were performed, significant associations between oxidative damage to

lipids and UA ($r = 0.23$, $p = 0.03$), TAA and Sr ($r = -0.40$, $p = 0.0001$) and TAA and UA ($r = -0.63$, $p < 0.0001$) were found. Positive correlations between lipid peroxidation/TAA ratio and Sr ($r = 0.38$, $p = 0.0002$) and UA ($r = 0.63$, $p < 0.0001$) were also obtained.

3.9. Discussion

To our knowledge, this is the first study in which Sr serum levels at three different stages of pregnancy (early, mid and late) are determined. The concentrations obtained in non-pregnant women are in line with previous studies [21–25]. However, only a few studies evaluating Sr during pregnancy are available. Wang et al. [24] measured Sr in the serum of 90 healthy pregnant women by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES), obtaining similar concentrations (24.5 ± 5.5 µg/L) to those obtained in our study. Unfortunately, no data on the gestational week of sampling were provided. Silberstein et al. [26] also measured Sr by ICP-MS in the serum of 40 pregnant women at gestational weeks 16–21, finding slightly higher concentrations (54 ± 13 µg/L). More recently, Rezende et al. [14] measured the plasmatic Sr concentrations of 51 women in the 3rd trimester of pregnancy, by using ICP-MS, finding very similar levels (38 ± 1.4 µg/L) to those obtained by us.

As we have shown, Sr seems to increase during the 3rd trimester of pregnancy. However, the reason for this is unknown. Strontium levels may increase as a physiological response to pregnancy or as a consequence of changes in calcium concentration, since both elements share the same carrier system. To clarify this, Ca concentration was measured in the majority of participants in this study and no correlation

Table 4
Oxidative stress parameters measured in non-pregnant women, serial samples of 20 pregnant women at early- and late-pregnancy and post-partum women (mean ± SD).

	NPG n = 25		1Tss n = 20		3Tss n = 20		PPG n = 25	
Lipid peroxidation (nmol MDA + 4HNE/g prot)	65.7 ± 35.9 ^a		75.4 ± 26.7 ^{a,b}		99.3 ± 36.5 ^b		87.7 ± 42.3 ^{a,b}	
TAA (mg Tx/g prot)	3.76 ± 1.72 ^a		5.65 ± 2.64 ^b		3.19 ± 1.02 ^{a,c}		2.19 ± 0.95 ^c	
Lipid peroxidation/TAA ratio	22.4 ± 19.4 ^{a,b}		16.0 ± 9.0 ^a		33.5 ± 16.7 ^b		45.0 ± 24.5 ^c	
P values	NPG vs			1Tss vs			3Tss vs	
	1Tss	3Tss	PPG	3Tss	PPG	PPG		
Lipid peroxidation	ns	**	ns	**	ns	ns		
TAA	**	ns	***	***	****	**		
Lipid peroxidation/TAA ratio	ns	ns	***	****	****	ns		

NPG, non-pregnant group; 1Tss and 3Tss, first and third trimester in serial samples group; PPG, postpartum group; TAA, total antioxidant activity. ^{a,b,c} Similar alphabets in a row do not differ significantly at $p \geq 0.05$. p values for lipid peroxidation, TAA and lipid peroxidation/TAA ratio were 0.02, < 0.001 and < 0.001 respectively (analysis of variance). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = non-significant. p values based on independent/paired samples Student's t -test.

was found between the two elements ($r = -0.07, p = 0.59$). Various studies have shown that concentrations of trace elements, such as Cu, Se and Zn, are altered during pregnancy [27–31]. We performed the analysis of these elements in serial samples of 20 pregnant women to compare their kinetics with the Sr's, and we found significant differences. Copper rises during pregnancy, as does Sr, but while increases of Cu happen earlier, between the 1st and 2nd trimesters, the increase of Sr occurs later, between the 2nd and 3rd trimesters. The same ascendant trend for Cu has been described in other longitudinal studies [27,28]. We found the lowest concentrations of Zn in the 2nd trimester, while there were no differences between the 1st and 3rd trimesters. These kinetics do not concur with the majority of published studies [27–31], in which Zn decreases as the pregnancy progresses, reaching its minimum values in the 3rd trimester. In any case, Zn levels seem to evolve differently to Sr concentrations. Finally, Se shows the opposite trend to Sr. It decreases as pregnancy progresses, especially during the 3rd trimester. Most studies have shown the same decreasing trend [32–34]. We can therefore verify that in healthy

pregnancy, Sr behaves differently to the other trace elements studied. Regarding UA concentrations, we observed that levels were lower in the 1TG, compared to the NPG ($p < 0.0001$). However, as the pregnancy progresses, the UA levels increase, reaching their peak values in the PPG. These results are consistent with those reported previously [35–38]. This seems to be explained by the fact that in normal pregnancy, circulating levels of UA are associated with the renal excretion of urate, which decreases in the 1st trimester, remains stable in the 2nd trimester and increases to normal/non-pregnant levels in the 3rd trimester [37]. In this study we found a strong positive correlation between UA and Sr, showing that both parameters correlate positively with gestational age. This suggests that there may be a relationship between UA, Sr and oxidative stress, since both parameters have been related to it [39–46]. To elucidate this point, we evaluated oxidative stress status through the measurement of TAA and lipid peroxidation. We found that both oxidative stress parameters rise in the 1st trimester of pregnancy but continue with different kinetics, as while TAA drops significantly in the

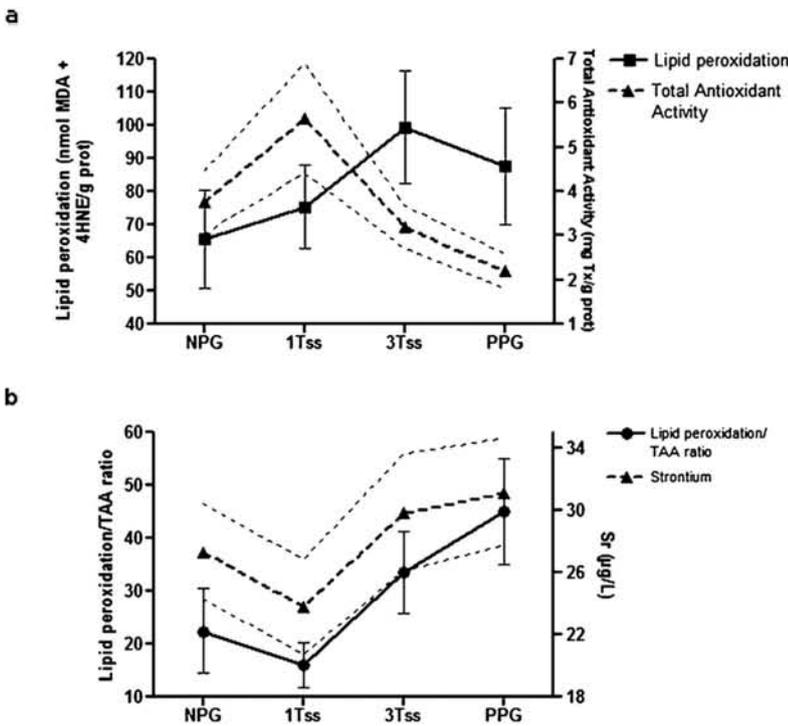


Fig. 2. Evolution of oxidative stress parameters (a), lipid peroxidation/TAA ratio and Sr levels (b) in non-pregnant women, during pregnancy and postpartum. NPG, non-pregnant group; 1Tss and 3Tss, first and third trimester in serial samples group; PPG, postpartum group.

3rd trimester, reaching the minimum value in postpartum, lipid peroxidation continues to increase during pregnancy and only begins to decline in the postpartum group (Fig. 2a).

The association of normal pregnancy with elevated lipid peroxidation levels has been established previously [8,9,12,13,47–49]. If we look for data about how oxidative stress varies throughout normal pregnancy, we find that most studies observe an ascendant trend [9,10,48], although there are studies in which serum levels of lipid peroxides remained relatively stable throughout gestation [49]. Regarding antioxidant defense, it is not as clear how it evolves during pregnancy, as there are some contradictory results [9,11,38,47]. Although we observed a decreasing trend in TAA during pregnancy, our data reveal a higher elevation of TAA at the beginning of pregnancy, while the elevation of oxidative damage at this time is still discrete. We suggest that the body's defense system is on alert and responds rapidly to the slightest sign of oxidative damage, with an increase of antioxidant defense. In this way, it tries to compensate for the possible oxidative damage. Walsh et al. [50] reported that in normal pregnancy, there is a balance between peroxidation of lipids and antioxidant processes, and that is what is perceived when observing the kinetics of both measured parameters at the beginning of pregnancy, although if we focus on the ascendant trend of the lipid peroxidation/TAA ratio, the balance falls in favor of the oxidative stress during the rest of the pregnancy.

When it comes to the lower levels of oxidative stress parameters obtained in the postpartum group, Davidge et al. found similar results [11]. This is consistent with the fact that the physiological state of pregnancy, *per se*, leads to an increase in oxidative stress: once the body has given birth, the factors causing oxidative damage disappear, and thus both oxidative stress parameters decrease.

Both Sr and UA correlated negatively with TAA and positively with the oxidative stress ratio. Uric acid has been proposed in several studies as a marker of oxidative stress, tissue damage and renal dysfunction [39,40]. Given these results, we are not the first to suggest a relationship between Sr and oxidative stress, since several studies have already verified it [42–46], although these studies have not been performed in the context of pregnancy. Most of these studies suggest that Sr has a scavenging effect on lipid peroxidation, playing a preventive role in oxidative damage. It can therefore be suggested that Sr levels rise when some kind of oxidative damage exists, and this elevation attempts in some way to restore the balance between the organism's defense and its oxidative damage.

4. Conclusion

Strontium seems to play a role in the organism's oxidative status, possibly rising in an attempt to cope with the oxidative damage that develops physiologically in pregnancy. Further studies involving Sr and pathologies of pregnancy are warranted.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

We thank all the women who participated in the study. Thanks to M^oEulalia Amieva Fernández, Clara M^o Vázquez Tuñón (Nursing supervisors of the Medicine Laboratory, HUCA) and Ana I. Escudero (Obstetric and Gynecology Service, HUCA) for help with the coordination of sampling. Thanks also to the staff of the Extractions Area (HUCA) and to Verónica Rodríguez Casado for the work with the sample biobank.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.021>.

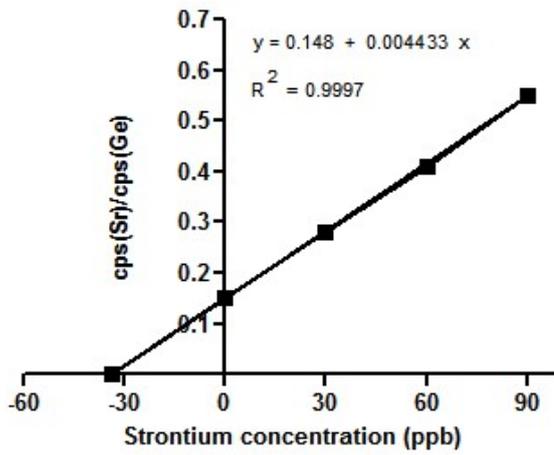
References

- [1] N. Al-Jameil, H. Tabassum, H. Al-Mayouf, H.I. Aljohar, N.D. Alenzi, S.M. Hijazy, F.A. Khan, Analysis of serum trace elements-copper, manganese and zinc in pre-eclamptic pregnant women by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a prospective case controlled study in Riyadh, Saudi Arabia, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (5) (2014) 1900–1910.
- [2] T. Ahsan, S. Banu, Q. Nahar, M. Ahsan, M.N. Khan, S.N. Islam, Serum trace elements levels in preeclampsia and eclampsia: correlation with the pregnancy disorder, *Biol. Trace Elem. Res.* 152 (3) (2013) 327–332.
- [3] M.P. Rayman, H. Wijnen, H. Vader, L. Kooistra, V. Pop, Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth, *CMAJ* 183 (5) (2011) 549–555.
- [4] A. Maleki, M.K. Fard, D.H. Zadeh, M.A. Mamegani, S. Abasaizadeh, S. Mazloomzadeh, The relationship between plasma level of Se and preeclampsia, *Hypertens Pregnancy* 30 (2) (2011) 180–187.
- [5] A.B. Mariath, D.P. Bergamaschi, P.H. Rondo, A.C. Tanaka, F. Hinnig Pde, J.F. Abbade, S.G. Diniz, The possible role of selenium status in adverse pregnancy outcomes, *Br. J. Nutr.* 105 (10) (2011) 1418–1428.
- [6] R. Negro, G. Greco, T. Mangieri, A. Pezzarossa, D. Dazzi, H. Hassan, The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (4) (2007) 1263–1268.
- [7] M.P. Rayman, P. Bode, C.W. Redman, Low selenium status is associated with the occurrence of the pregnancy disease preeclampsia in women from the United Kingdom, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189 (5) (2003) 1343–1349.
- [8] J.M. Morris, N.K. Gopaul, M.J. Endresen, M. Knight, E.A. Linton, S. Dhir, E.E. Anggard, C.W. Redman, Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 105 (11) (1998) 1195–1199.
- [9] S.A. Bukhari, M.I. Rajoka, Z. Ibrahim, F. Jalal, S.M. Rana, S.A. Nagra, Oxidative stress elevated DNA damage and homocysteine level in normal pregnant women in a segment of Pakistani population, *Mol. Biol. Rep.* 38 (4) (2011) 2703–2710.
- [10] S.L. Loy, S. Kns, H.J. Jm, Increase in maternal adiposity and poor lipid profile is associated with oxidative stress markers during pregnancy, *Prev. Med.* 57 (Suppl) (2013) S41–S44.
- [11] S.T. Davidge, C.A. Hubel, R.D. Brayden, E.C. Capeless, M.K. McLaughlin, Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies, *Obstet. Gynecol.* 79 (6) (1992) 897–901.
- [12] F. Mahmoud, H. Abul, A. Dashti, W. Al-Jassar, A. Omu, Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes mellitus at third trimester of pregnancy, *Acta Med. Acad.* 41 (2) (2012) 175–185.
- [13] Y. Atamer, Y. Kocycigit, B. Yokus, A. Atamer, A.C. Erden, Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 119 (1) (2005) 60–66.
- [14] V.B. Rezende, F. Barbosa, A.C. Palei, R.C. Cavalli, J.E. Tanus-Santos, V.C. Sandrim, Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 130–135.
- [15] J.B. Cannata-Andía, M. Rodríguez-García, C. Gómez-Alonso, Mecanismo de acción del ranelato de estroncio, *Rev. Osteoporos Metab. Miner.* 2 (Suppl. 1) (2010) 85–89.
- [16] C.a.L.S. Institute, User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline, (2006) (pp. EP15-A2).
- [17] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [18] D. Gerard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Regnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, J. Chaudiere, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (10) (1998) 1176–1183.
- [19] M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* 73 (2001) 6.
- [20] D. de Gonzalo-Calvo, K. Neitzert, M. Fernandez, I. Vega-Naredo, B. Caballero, M. Garcia-Macia, F.M. Suarez, M.J. Rodriguez-Colunga, J.J. Solano, A. Coto-Montes, Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (5) (2010) 733–737.
- [21] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biol. Trace Elem. Res.* 80 (1) (2001) 77–93.
- [22] P.J. Meunier, C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J.E. Badurski, T.D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E.M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H.K. Genant, J.Y. Reginster, The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.* 350 (5) (2004) 459–468.
- [23] C. Vandecasteele, H. Vanhoe, R. Dams, J. Versieck, Determination of trace elements in human serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Comparison with nuclear analytical techniques, *Biol. Trace Elem. Res.* 26–27 (1990) 553–560.
- [24] Y. Wang, M. Tan, Z. Huang, L. Sheng, Y. Ge, H. Zhang, M. Jiang, G. Zhang, Elemental contents in serum of pregnant women with gestational diabetes mellitus, *Biol. Trace Elem. Res.* 88 (2) (2002) 113–118.
- [25] G. Forte, A. Visconti, S. Santucci, A. Ghazaryan, L. Figa-Talamanca, S. Cannoni,

- B. Bocca, A. Pino, N. Violante, A. Alimonti, M. Salvetti, G. Ristori, Quantification of chemical elements in blood of patients affected by multiple sclerosis, *Ann. Ist. Super. Sanita* 41 (2) (2005) 213–216.
- [26] T. Silberstein, M. Saphier, Y. Mashiach, O. Paz-Tal, O. Saphier, Elements in maternal blood and amniotic fluid determined by ICP-MS, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 28 (1) (2015) 88–92.
- [27] F.M. Tabrizi, F.G. Pakdel, Serum level of some minerals during three trimesters of pregnancy in Iranian women and their newborns: a longitudinal study, *Indian J. Clin. Biochem.* 29 (2) (2014) 174–180.
- [28] J. Liu, H. Yang, H. Shi, C. Shen, W. Zhou, Q. Dai, Y. Jiang, Blood copper, zinc, calcium, and magnesium levels during different duration of pregnancy in Chinese, *Biol. Trace Elem. Res.* 135 (1–3) (2010) 31–37.
- [29] F. Khoushabi, M.R. Shadan, A. Miri, J. Sharifi-Rad, Determination of maternal serum zinc, iron, calcium and magnesium during pregnancy in pregnant women and umbilical cord blood and their association with outcome of pregnancy, *Mater. Sociomed.* 28 (2) (2016) 104–107.
- [30] A. Basu, J.Y. Yu, A.J. Jenkins, A.J. Nankervis, K.F. Hanssen, T. Henriksen, B. Lorentzen, S.K. Garg, M.K. Menard, S.M. Hammad, J.A. Scardo, C.E. Aston, T.J. Lyons, Trace elements as predictors of preeclampsia in type 1 diabetic pregnancy, *Nutr. Res.* 35 (5) (2015) 421–430.
- [31] N.F. Ruiz, L. Meertens, E. Pena, A. Sanchez, L. Solano, Behavior of serum zinc levels during pregnancy, *Arch. Latinoam. Nutr.* 55 (3) (2005) 235–244.
- [32] J.A. Butler, P.D. Whanger, M.J. Tripp, Blood selenium and glutathione peroxidase activity in pregnant women: comparative assays in primates and other animals, *Am. J. Clin. Nutr.* 36 (1) (1982) 15–23.
- [33] M. Tan, L. Sheng, Y. Qian, Y. Ge, Y. Wang, H. Zhang, M. Jiang, G. Zhang, Changes of serum selenium in pregnant women with gestational diabetes mellitus, *Biol. Trace Elem. Res.* 83 (3) (2001) 231–237.
- [34] E. Ferrer, A. Alegria, R. Barbera, R. Farre, M.J. Lagarda, J. Monleon, Whole blood selenium content in pregnant women, *Sci. Total Environ.* 227 (2–3) (1999) 139–143.
- [35] Q. Chen, S. Lau, M. Tong, J. Wei, F. Shen, J. Zhao, M. Zhao, Serum uric acid may not be involved in the development of preeclampsia, *J. Hum. Hypertens* 30 (2) (2015) 136–140.
- [36] A.I. Corominas, S.M. Balconi, M. Palermo, B. Maskin, A.E. Damiano, Serum uric acid levels and risk of developing preeclampsia, *Medicina (B Aires)* 74 (6) (2014) 462–471.
- [37] J.A. Boyle, S. Campbell, A.M. Duncan, W.R. Greig, W.W. Buchanan, Serum uric acid levels in normal pregnancy with observations on the renal excretion of urate in pregnancy, *J. Clin. Pathol.* 19 (5) (1966) 501–503.
- [38] L. Belo, M. Caslake, A. Santos-Silva, E.M. Castro, L. Pereira-Leite, A. Quintanilha, I. Rebelo, LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study, *Atherosclerosis* 177 (2) (2004) 391–399.
- [39] T.L. Hawkins, J.M. Roberts, G.J. Mangos, G.K. Davis, L.M. Roberts, M.A. Brown, Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study, *BJOG* 119 (4) (2012) 484–492.
- [40] D.C. Hooper, S. Spitsin, R.B. Kean, J.M. Champion, G.M. Dickson, I. Chaudhry, H. Koprowski, Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (2) (1998) 675–680.
- [41] K. Watanabe, T. Mori, A. Iwasaki, C. Kimura, H. Matsushita, K. Shinohara, A. Wakatsuki, Increased oxidant generation in the metabolism of hypoxanthine to uric acid and endothelial dysfunction in early-onset and late-onset preeclamptic women, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 25 (12) (2012) 2662–2666.
- [42] S. Yalin, O. Sagir, U. Comelekoglu, M. Berkoz, P. Eroglu, Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model, *Pharmacol. Rep.* 64 (2) (2012) 396–402.
- [43] S. Lu, L. Ren, J. Fang, J. Ji, G. Liu, J. Zhang, H. Zhang, R. Luo, K. Lin, R. Fan, Trace elements are associated with urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level: a case study of college students in Guangzhou, China, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23 (9) (2016) 8484–8491.
- [44] S.M. El-Megharbel, R.Z. Hamza, M.S. Refat, Synthesis, spectroscopic and thermal studies of Mg(II) Ca(II), Sr(II) and Ba(II) diclofenac sodium complexes as anti-inflammatory drug and their protective effects on renal functions impairment and oxidative stress, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 135 (2015) 915–928.
- [45] R.P. Radzki, M. Bienko, R. Filip, E. Albera, M. Kankofer, Effect of strontium ranelate on femur densitometry and antioxidative/oxidative status in castrated male rats, *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 36 (2) (2009) 9.
- [46] Y. Bai, W. Feng, S. Wang, X. Zhang, W. Zhang, M. He, T. Wu, H. Guo, Essential metals zinc, selenium, and strontium protect against chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2) (2016) 951–960.
- [47] L.M. Cranfield, J.L. Gollan, A.G. White, T.L. Dormandy, Serum antioxidant activity in normal and abnormal subjects, *Ann. Clin. Biochem.* 16 (6) (1979) 299–306.
- [48] D. Wickens, M.H. Wilkins, J. Lunec, G. Ball, T.L. Dormandy, Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy, *Ann. Clin. Biochem.* 18 (Pt 3) (1981) 158–162.
- [49] Y.P. Wang, S.W. Walsh, J.D. Guo, J.Y. Zhang, Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E, and lipid peroxides throughout normal pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165 (6 Pt 1) (1991) 1690–1694.
- [50] S.A. Walsh, S.W. Karger, Hypertension in Pregnancy, *World Review of Nutrition and Dietetics*, Switzerland, 1994.
- [51] W. Thefeld, H. Hoffmeister, E.W. Busche, P.U. Koller, J. Vollmar, Normal values of serum uric acid levels in relation to age and sex as determined using a new enzymatic uric acid color test, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 98 (8) (1973) 380–384.
- [52] W. AHB, *Tietz Clinica Guide to Laboratory Tests*, Saunders Elsevier, St. Louis (MO), 2006, pp. 202–207.
- [53] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Brunts, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Elsevier Health Sciences, 2012.

SUPPLEMENTARY DATA:

Figure S1. Standard additions method



4.2 Estroncio y su papel en la preeclampsia

Artículo 2: Clara Barneo-Caragol, Eduardo Martínez-Morillo, Susana Rodríguez-González, Paloma Lequerica-Fernández, Ignacio Vega-Naredo, Francisco V. Álvarez. “Strontium and its role in preeclampsia”.

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 47 (2018) 37–44

Doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.003

JCR Impact Factor: 3.755; Rank: 88/293; Quartile: Q2

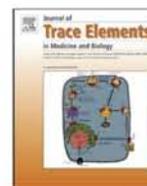
Publicado en mayo del 2018, este trabajo supuso la primera aproximación exploratoria de la posible utilidad del Sr como biomarcador de PE. Se compararon los niveles séricos de Sr y estrés oxidativo en gestantes con PE frente a gestantes sanas y con HTAG. Se utilizaron los resultados de las gestantes sanas obtenidos en el primer trabajo, como parte del grupo control, junto a las gestantes con HTAG del actual trabajo. En el caso de gestantes con PE o HTAG, los parámetros se analizaron en la muestra de suero disponible más cercana al parto, y en las muestras obtenidas en el 1^{er} trimestre de gestación (cuando estuvieron disponibles), provenientes del programa autonómico de cribado combinado para la detección de aneuploidías fetales. Además, 20 gestantes con PE (8 PEP y 12 PET) fueron seriadas a lo largo del embarazo. Evaluamos de nuevo el Ca y el ácido úrico, y añadimos el NT-proBNP y los factores relacionados con la angiogénesis (sFlt-1 y PlGF).

Contribución personal al trabajo:

- Selección de participantes, en base al diagnóstico final y de no cumplimiento de criterios de exclusión (menor de edad, gestación múltiple, o muestra posparto), y recuperación de la muestra más cercana al parto (seroteca ya conformada previamente de las muestras de gestantes que acudieron al Servicio de Urgencias del HUCA con sospecha de PE) y de la muestra disponible del 1^{er} trimestre (seroteca ya conformada previamente

de las muestras del programa autonómico de cribado combinado del 1^{er} trimestre para la detección de aneuploidías fetales), para su análisis.

- Análisis de los parámetros estudiados:
 - Manejo del equipo ICP-MS para el análisis del Sr.
 - Manejo de equipos automatizados para el análisis del Ca y del NT-proBNP.
- Mantenimiento de la comunicación entre el laboratorio de Bioquímica del HUCA y el laboratorio del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo. Selección aleatoria de muestras y su transporte entre ambos laboratorios.
- Manejo de base de datos y consulta de las características clínicas de la población estudiada. Análisis estadísticos, elaboración de tablas y figuras y redacción del manuscrito bajo la supervisión del Dr. Martínez Morillo y del Dr.Álvarez.



Biochemistry

Strontium and its role in preeclampsia

Clara Barneo-Caragol^{a,*}, Eduardo Martínez-Morillo^a, Susana Rodríguez-González^b,
Paloma Lequerica-Fernández^a, Ignacio Vega-Naredo^b, Francisco V. Álvarez Menéndez^{a,c}

^a Laboratory of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Av. de Roma, s/n, 33011, Oviedo, Asturias, Spain

^b Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Av. Julián Clavería, s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, C/ Fernando Bongera s/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Strontium

Preeclampsia

Trace elements

Oxidative stress

Inductively coupled plasma-mass spectrometry

OPG/RANKL/RANK system

ABSTRACT

Background: Preeclampsia (PE) is considered a specific vascular disease in which endothelial dysfunction may be the crucial factor of its pathogenesis. It has been suggested that strontium (Sr) may play a role in the pathophysiology of PE. Our group established in a previous study the serum levels of Sr in healthy pregnancies, and the main aim of the present study was to evaluate Sr concentrations and oxidative status in preeclamptic women. **Methods:** The study population included women with early-onset PE (E-PE, n = 39), late-onset PE (L-PE, n = 67) and serial samples from a subset of preeclamptic women (PE-ss, n = 20). The control group included women with gestational hypertension (GH, n = 56) and healthy pregnancies (samples collected in the 1st (n = 50), 2nd (n = 51) and 3rd trimesters (n = 53)). Strontium, calcium (Ca), uric acid (UA), placental growth factor (PIGF), soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), lipid peroxidation and total antioxidant activity (TAA) were measured in these samples. **Results:** Mean Sr levels were significantly higher in PE than in control groups ($p \leq 0.0001$). Calcium values were found to be significantly lower in E-PE compared to control groups ($p = 0.03$). Higher levels of NT-proBNP were found in PE vs. control groups ($p < 0.001$). sFlt-1/PIGF ratio was higher in E-PE compared to L-PE and GH ($p < 0.001$). Uric acid levels in PE were significantly higher than in control groups ($p < 0.0001$). There was a strong positive correlation between UA and Sr in the E-PE serial samples ($r = 0.80$, $p < 0.0001$). Lipid peroxidation and lipid peroxidation/TAA ratios were found to be higher in PE, with lower values of TAA. **Conclusion:** The higher levels of Sr and the alterations of redox status found in preeclamptic women, along with the strong correlation between UA and Sr suggest that this element may be involved in the pathogenesis of PE.

1. Introduction

Endothelial dysfunction contributes significantly to the pathogenesis of preeclampsia (PE) and has been related to the oxidative stress of placenta [1–7]. Oxidative stress is manifested at the maternal–fetal interface from early pregnancy onwards [4], but in the case of PE, an imbalance between the enzymatic antioxidant activity and the formation of lipid peroxides takes place [5,8–11]. Thus, trace elements involved in the antioxidant system, such as copper, selenium and zinc, have been studied in preeclamptic pregnancies [11–14], yielding contradictory results and, therefore, failing to reach a consensus regarding

the relationship between the deficiency/excess of these elements and PE. One of these trace elements, strontium (Sr), has recently been associated with the pathophysiology of PE [15]. In addition, strontium ranelate, a medication for osteoporosis, has been linked to an increased risk of cardiovascular and thromboembolic events [16,17].

Since PE is considered a specific vascular disease, in which endothelial dysfunction may be the crucial factor of its pathogenesis [18], and taking into account the above, we speculated that Sr may be involved in the pathogenesis of PE. The aims of this study were: i) to evaluate the serum concentrations of Sr in patients with early- and late-onset PE and compare them with the levels in non-preeclamptic

Abbreviations: 1TC, 1st trimester control group; 1T non-PE, 1st trimester of non-preeclamptic women; 1T-PE, 1st trimester of preeclamptic women; 2TC, 2nd trimester control group; 3TC, 3rd trimester control group; Ca, calcium; E-PE, early-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectrometry; L-PE, late-onset preeclampsia; MDA, malondialdehyde; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; PE, preeclampsia; PE-ss, serial samples of preeclamptic women; PIGF, placental growth factor; ROC, receiver operating characteristic; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; Sr, strontium; TAA, total antioxidant activity; UA, uric acid

* Corresponding author at: Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain.

E-mail addresses: clara.barneo@sespa.es (C. Barneo-Caragol), eduardo.martinez@sespa.es (E. Martínez-Morillo), rodriguezgsusana@uniovi.es (S. Rodríguez-González), paloma.lequerica@sespa.es (P. Lequerica-Fernández), vegaignacio@uniovi.es (I. Vega-Naredo), fvalvarez@uniovi.es (F.V. Álvarez Menéndez).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.003>

Received 3 December 2017; Received in revised form 8 January 2018; Accepted 12 January 2018
0946-672X/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

pregnant women; ii) to determine the diagnostic value of Sr; iii) to assess the cardiovascular function through measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) serum levels; iv) to determine the concentrations of other analytes (calcium (Ca), uric acid (UA), soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF)), to elucidate their possible relation with Sr and v) to evaluate and compare the redox status in a subset of patients and healthy controls and determine its association with Sr concentrations.

2. Material and methods

2.1. Study population

A total of 162 participants were enrolled in the study between October 2012 and June 2016. Serum samples from pregnant women with suspected PE diagnosis were collected at the Emergency Room of Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) and analyzed at the Laboratory of Medicine (HUCA). Diagnosis of PE was made according to the classical criteria: onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation [19], being considered early-onset PE before gestational week 34 and late-onset PE after 34 gestational weeks. The study population was split in three groups, depending on the final diagnosis: early-onset PE (E-PE, $n = 39$), late-onset PE (L-PE, $n = 67$) and gestational hypertension (GH, $n = 56$), considering the latter as part of the control group. When several samples were collected from the same patient, the analyzed sample was the closest to the time of delivery. Whenever it was available, first trimester samples were recovered from a Biobank composed of specimens used in HUCA's First Trimester Combined Screening Program for Fetal Aneuploidies. Twenty preeclamptic women who had several samples collected throughout the pregnancy were selected (8 E-PE and 12 L-PE), forming an additional PE group of serial samples (PE-ss).

The control group was formed by 56 pregnant women with gestational hypertension previously mentioned and 154 healthy pregnant women whose samples were collected in the 1st (1TC, $n = 50$), 2nd (2TC, $n = 51$) and 3rd gestational trimesters (3TC, $n = 53$), and analyzed in our previous study [20]. Clinical data from all participants, including maternal age, gestational week of sampling and delivery and type of delivery were collected from their medical records by using the software products Cerner Millennium[®] and GestLab[®]. The study population, including the control group from our previous study [20], is shown in Fig. 1.

2.2. Exclusion criteria

Participants with multiple gestation ($n = 29$) and whose sample was collected post-partum ($n = 2$) were excluded from the study. In addition, one participant younger than 18 years old was also excluded.

2.3. Collection of serum samples

Samples were collected in BD Vacutainer[®] red top tubes with no additives. Serum was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C, and UA, PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP were measured at the Emergency Biochemistry Laboratory of HUCA. After that, serum was aliquoted and stored at -40 °C until assayed for the rest of parameters.

In all these samples, Sr and Ca were also measured. A total of 40 serum samples from different groups (10 from E-PE, 10 from L-PE, 10 from GH and 10 collected at the 1st trimester of preeclamptic women) were randomly selected to evaluate redox status, by measuring lipid peroxidation and total antioxidant activity (TAA) at the Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo. Likewise, 20 samples from the previous study [20] were randomly selected and recovered (10 from 1TC and 10 from 3TC) to perform the same redox status assessment.

Some analytes could not be measured in all samples due to

insufficient volume. The analytes and samples assayed are shown in Supplementary data, Table S1.

2.4. ICP-MS method and sample preparation

An alkaline working solution with 1% ammonium hydroxide, 0.05% EDTA, 0.05% Triton X-100, 4% butan-1-ol and 20 µg/L of internal standard (⁷²Ge) was first prepared. The pH of this solution was 10.7. Serum samples were diluted 1:20 with this solution prior to analysis. The limit of quantification and calibration range for Sr (6-point calibration) were 3.25 (0–60) µg/L. The integration time was 2 s for ⁸⁸Sr and 0.5 s for ⁷²Ge. The total acquisition time was 14 s, measurements were performed in triplicate using an ICP-MS 7700 x from Agilent Technologies[®] and total analysis time was less than three minutes per sample. In the collision cell, the helium flow was on (flow rate of 4.5 ml/min). The octopole voltages were: Bias = -18.0 V, RF = 200 V, and the energy discrimination was set at 3.0 V.

2.5. Spectrophotometry and electrochemiluminescence immunoassay methods

Calcium and UA levels were determined on the automated auto-analyzer Cobas c601 (Roche Diagnostics, Germany) by a spectrophotometric assay (Elecsys[®]). The measuring intervals were 0.2–5 mmol/L and 0.2–25 mg/dL for Ca and UA, respectively. The coefficients of variation were ≤2.5% and ≤1.6% for Ca and UA, respectively. The lower detection limits for Ca and UA were 0.2 mmol/L and 0.2 mg/dL, respectively.

PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP concentrations were measured by an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA, Elecsys[®]) on the automated immunoanalyzer Cobas e601 (Roche Diagnostics, Germany). The measuring intervals were 3–10000 pg/mL, 10–85000 pg/mL and 5–35000 pg/mL for PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP, respectively. The coefficients of variation were ≤4.6%, ≤5.6% and ≤3.1% for PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP, respectively. The lower detection limits for PlGF, sFlt-1 and NT-proBNP were 3, 10 and 5 pg/mL, respectively.

2.6. Redox status determination

The lipid peroxidation was used as an indicator of oxidative damage. This process leads to the production of lipid peroxides and its derivative end-products malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) that provide a convenient rate of lipid peroxidation [21]. MDA and 4-HNE content was determined using the 1-methyl-2-phenylindole method, based on the condensation of the chromogenic agent 1-methyl-2-phenylindole with either MDA or 4-HNE [22]. The results are expressed as nmol MDA + 4-HNE/g protein.

The total antioxidant activity was determined using the ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) cation radical method [23] modified for blood samples [24]. Results are expressed in equivalents of mg Trolox/g protein.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with MedCalc[®] 12.5.0. Continuous variables were expressed as means and standard deviations whereas discrete variables were expressed as numbers or percentages. Normal distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. When the data did not follow a normal distribution (even using the logarithmic transformation), the variables were expressed as median and interquartile range. Analysis of variance test was used to compare various groups with independent samples. Student's *t*-tests were used for comparison between two groups of independent and paired samples. The Welch test was used for independent samples with unequal variances. Mann-Whitney tests were used when any of the groups compared did not follow a normal distribution. Receiver operating

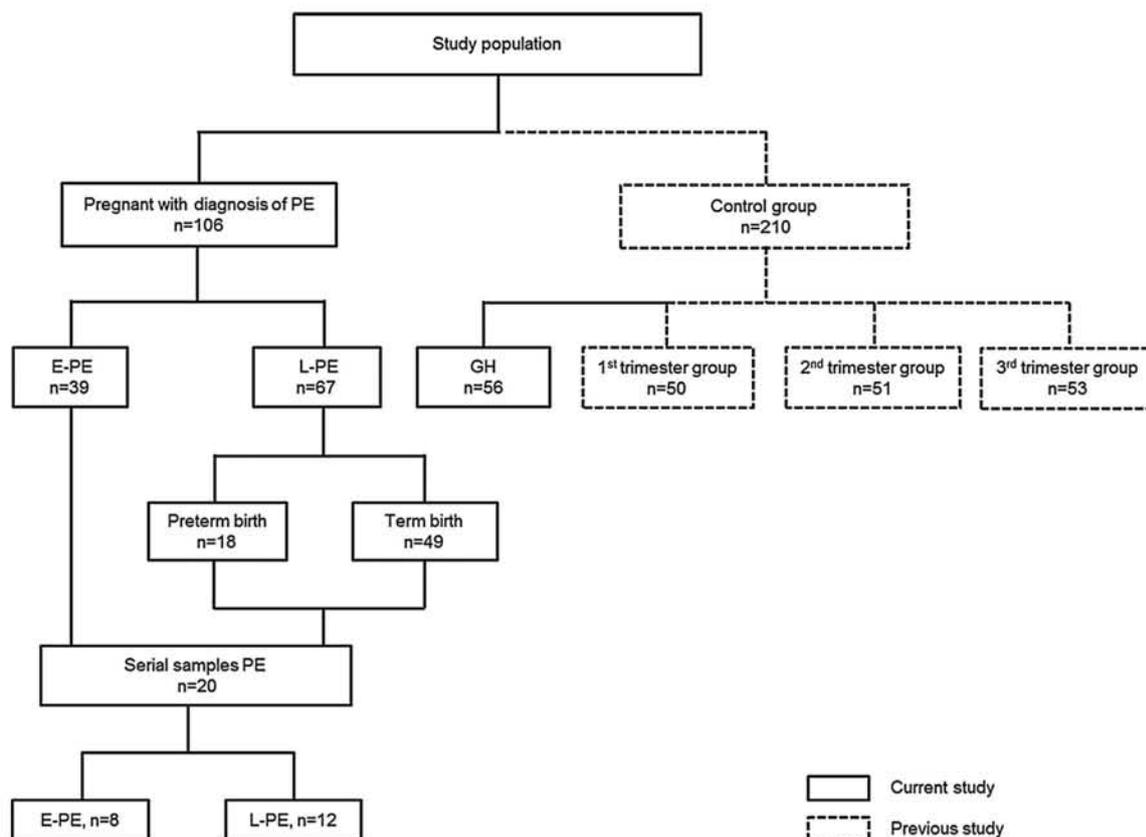


Fig. 1. Study population.

characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the optimal cut-off value for Sr to diagnose PE. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant. Associations between variables were assessed using the Pearson product-moment correlation coefficient or the Spearman's rank correlation coefficient.

2.8. Ethics

Ethics approval was obtained from the institutional review board. The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct in research involving human subjects. Informed consent was obtained from all participants.

3. Results and discussion

3.1. Analytic characteristics of ICP-MS method

The mean Sr level obtained in the pool of serum samples used as internal quality control was $33.2 \mu\text{g/L}$. Imprecision, bias and total error were: 4.3, -0.2 and 7.2%, respectively, and estimated with the internal quality control by following the CLSI guidelines EP15-A2 [25].

3.2. Study population

A total of 162 patients aged from 18 to 46 years were included in the study, with a median age of 35 (31–37) years. There were no significant differences among groups ($p > 0.05$). Mean gestational week of extraction in the 1st trimester was 10.6 ± 0.7 in all pregnant women. Due to the differences observed in the median gestational week at the time of extraction between E-PE (31.1 [28.9–32.6]) and 2TC (25.0

[24.6–25.7]), and between E-PE and 3TC (36.7 [36.3–37.6]) ($p < 0.0001$), an early control group (2TC + 3TC) was created in order to be compared with E-PE (E-PE: 31.1 [28.9–32.6] vs. C2T + C3T: 36.1 [25.1–36.7], $p > 0.05$). A further comparison was made between E-PE (31.1 [28.9–32.6]) and 2TC + GH (30.9 [25.0–37.4]), $p > 0.05$, in order to include pregnant women with hypertension in the early control group. A late control group (3TC + GH: 36.8 [36.3–38.4]) was created to be compared with L-PE (37.3 [35.9–38.8]), $p > 0.05$.

The gestational week at diagnosis of E-PE or L-PE was significantly different (29.9 ± 2.8 vs. 37.3 ± 1.9 , $p < 0.0001$). The mean gestational week at the time of delivery was 31.3 ± 3.2 , 38.0 ± 1.8 and 38.9 ± 1.5 , in E-PE, L-PE and GH, respectively. Clinical data of the study population, including the control group from our previous study [20], are contained in Table 1.

3.3. Serum strontium concentrations

Mean Sr levels in E-PE ($40.9 \pm 13.9 \mu\text{g/L}$) were significantly higher ($p = 0.0001$) than in early control groups (2TC + 3TC ($30.5 \pm 9.4 \mu\text{g/L}$) and 2TC + GH ($32.2 \pm 10.9 \mu\text{g/L}$)) (Table 2 and Fig. 2). When L-PE was compared with the late control group (3TC + GH), significant differences were also found (42.6 ± 10.8 vs. $35.1 \pm 10.9 \mu\text{g/L}$, $p < 0.0001$). No significant differences in Sr concentration were found in the 1st trimester of pregnancy between pregnant women who later developed PE (1T-PE: 1st trimester samples from E-PE and L-PE, $26.4 \pm 8.3 \mu\text{g/L}$) and those who did not (1T non-PE: 1st trimester samples from GH and 1TC, $26.6 \pm 9.1 \mu\text{g/L}$, $p > 0.05$) (Table S2, Supplementary data).

An ascendant trend was observed in Sr levels of PE-ss, showing a statistically significant positive correlation between Sr and gestational week of sampling ($r = 0.52$, $p < 0.0001$), with this correlation being

Table 1
Clinical characteristics of the study population (mean \pm SD or median [interquartile range]).

	E-PE (n = 39)	L-PE (n = 67)	GH (n = 56)	1TC (n = 50)	2TC (n = 51)	3TC (n = 53)
Maternal age (years)	34.3 \pm 6.1	33.8 \pm 4.5	34.1 \pm 5.1	32.4 \pm 5.1	32.2 \pm 4.6	31.9 \pm 4.6
Gestational week of extraction	30.3 \pm 3.2	37.3 \pm 1.9	37.3 (35.9–38.8)	10.9 \pm 0.9	25.0 (24.6–25.7)	36.7 (36.3–37.6)
Gestational week of extraction in the 1st trimester	10.5 \pm 0.6 n = 24	10.6 \pm 0.7 n = 50	10.7 \pm 0.7 n = 48	–	–	–
Gestational week of diagnosis	29.9 \pm 2.8	37.3 \pm 1.9	–	–	–	–
Gestational week of delivery	31.3 \pm 3.2	38.0 \pm 1.8	38.9 \pm 1.5	40.3 \pm 1.3	39.6 \pm 1.3	40.3 \pm 1.2
Time between extraction and delivery date (days)	3.0 (1.0–7.0)	2.0 (1.0–5.0)	5.5 (2.0–16.0)	206.0 \pm 9.9	99.7 \pm 15.4	22.4 \pm 10.6
Type of delivery						
● Spontaneous	3 (8%)	26 (39%)	21 (37%)	33 (66%)	30 (59%)	27 (51%)
● Instrumental	1 (2%)	20 (30%)	18 (32%)	13 (26%)	15 (29%)	20 (38%)
● Cesarean	32 (82%)	21 (31%)	15 (27%)	3 (6%)	6 (12%)	6 (11%)
● Fetal demise	3 (8%)	–	–	–	–	–
● No data	–	–	2 (4%)	1 (2%)	–	–

E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; 1TC, 2TC and 3TC; 1st, 2nd and 3rd trimester control groups from a previous study [20].

stronger in L-PE ($r = 0.62$, $p < 0.0001$) than in E-PE ($r = 0.36$, $p < 0.01$) (Fig. S1, Supplementary data).

3.4. Diagnostic value of strontium

To obtain the diagnostic value of Sr, three ROC curve analyses were performed. When E-PE was compared with 2TC + 3TC, the area under the ROC curve (AUC) was 0.74, with a significance level of $p < 0.0001$, obtaining a sensitivity of 74.4% and specificity of 65.4% for a Sr value of 31.3 $\mu\text{g/L}$. For the other groups compared, the diagnostic value turned out to be slightly lower (AUC = 0.70 or 0.71, $p \leq 0.0002$). Data corresponding to each curve are represented in Fig. 3.

3.5. Serum calcium concentrations

Calcium values were found to be significantly lower in E-PE compared to 2TC + 3TC (2.18 \pm 0.2 vs. 2.25 \pm 0.1 mmol/L, $p = 0.03$), as well as when compared to 2TC + GH (2.26 \pm 0.1 mmol/L, $p = 0.03$), (Table 2).

Calcium levels did not correlate with the gestational week of extraction ($r = 0.14$, $p = 0.10$), and although a significant but weak negative correlation was found between Ca and Sr levels in all participants ($r = -0.23$, $p = 0.005$), this correlation turned out to be not significant in preeclamptic pregnant women ($r = -0.14$, $p = 0.20$).

3.6. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations

Mean NT-proBNP level in E-PE (426 pg/mL) exceeded the cutoff point for exclusion of heart failure (< 300 pg/mL) (Table 2). Of all samples analyzed, twenty-four had NT-proBNP values above this cut-off point, of which eighteen exceeded the established cutoff point (> 450 pg/mL) for the diagnosis of heart failure in adults under 50 years old [26], namely thirteen E-PE, four L-PE and one GH. Higher levels of NT-proBNP were found in E-PE (426.0 \pm 538.5 pg/mL) compared to 2TC + 3TC/2TC + GH (39.4 \pm 22.5/54.7 \pm 63.5, $p < 0.001$) and in L-PE compared to 3TC + GH (152.4 \pm 195.2 vs. 53.7 \pm 62.9 pg/mL, $p < 0.001$). In the 1st trimester, serum NT-proBNP levels were not significantly different between 1T-PE (58.9 \pm 37.8 pg/mL) and 1T non-PE (61.1 \pm 38.3, $p > 0.05$) (Table S2, Supplementary data). NT-proBNP levels were significantly higher in the samples closest to delivery than at the beginning of pregnancy in all pregnant women (154.4 \pm 334.1 vs. 58.8 \pm 38.3 pg/mL, $p < 0.05$), with this difference being more pronounced in E-PE (513.3 \pm 751.7 vs. 41.0 \pm 21.5 pg/mL, $p < 0.05$).

Finally, although a significant but weak positive correlation was found between NT-proBNP and Sr levels in all pregnant women ($r = 0.20$, $p = 0.009$), this correlation was found to be not significant when performed in preeclamptic pregnant women ($r = 0.15$, $p = 0.12$).

Table 2
Concentrations of strontium, uric acid, calcium, NT-proBNP and sFlt-1/PIGF ratio in each group (mean \pm SD).

	E-PE	L-PE	GH	2TC	3TC	P values		
						E-PE vs. 2TC + 3TC	E-PE vs. 2TC + GH	L-PE vs. 3TC + GH
Sr (21.0–100 $\mu\text{g/L}$) [59]	40.9 \pm 13.9 n = 39	42.6 \pm 10.8 n = 67	36.6 \pm 11.6 n = 56	27.4 \pm 7.8 n = 51	33.5 \pm 9.9 n = 53	***	***	****
Uric acid (2.4–4.9 and 3.1–6.3 mg/dL for 2nd and 3rd trimester, respectively) [27]	6.4 \pm 1.7 n = 39	5.6 \pm 1.0 n = 67	4.5 \pm 1.2 n = 56	3.2 \pm 0.7 n = 42	4.0 \pm 0.8 n = 53	****	****	****
Calcium (2.05–2.25 and 2.05–2.42 mmol/L for 2nd and 3rd trimester, respectively) [27]	2.18 \pm 0.2 n = 32	2.28 \pm 0.1 n = 53	2.29 \pm 0.1 n = 54	2.24 (2.18–2.27) n = 43	2.29 \pm 0.10 n = 53	*	*	ns
NT-proBNP (< 300 pg/mL) [26]	426.0 \pm 538.5 n = 39	152.4 \pm 195.2 n = 67	67.9 \pm 83.1 n = 56	40.2 \pm 23.9 n = 51	38.7 \pm 21.6 n = 53	***	***	***
sFlt-1/PIGF ratio (< 33) [36,37]	379.4 \pm 356.3 n = 39	112.3 \pm 77.7 n = 67	38.4 \pm 34.8 n = 56	–	–	–	–	–

E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; 2TC and 3TC, 2nd and 3rd trimester control groups from a previous study [20]. Variables that do not follow a normal distribution are expressed as median and interquartile range. *Cut-off point for exclusion of heart failure. **Cut-off point for exclusion of preeclampsia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = non-significant.

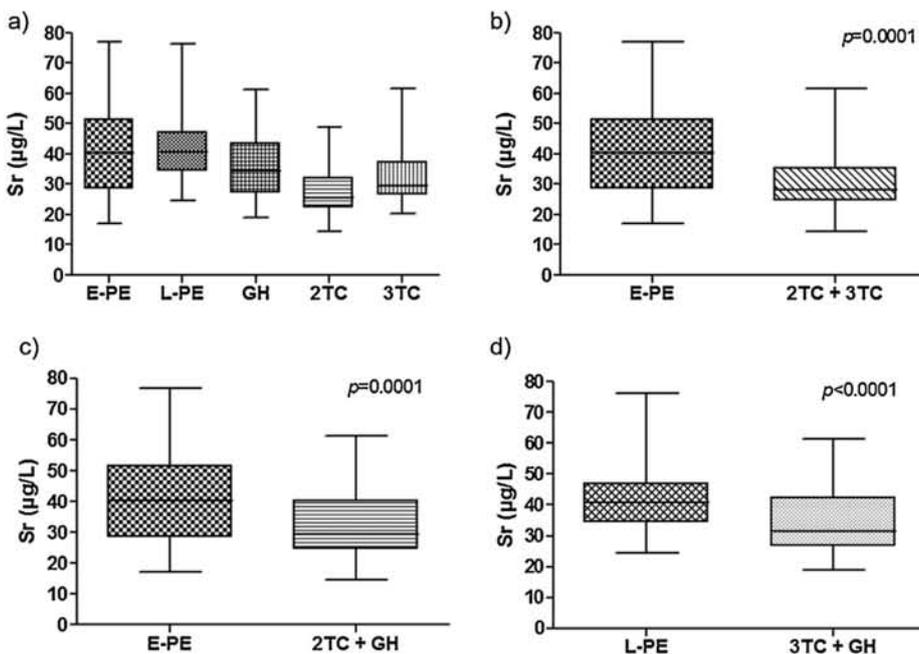


Fig. 2. Strontium values in the different groups (a), in E-PE vs. 2TC + 3TC (b), in E-PE vs. 2TC + GH (c) and in L-PE vs. 3TC + GH (d).

3.7. Soluble *fms*-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor ratio

The sFlt-1/PlGF ratio was different in the three groups analyzed, being higher in E-PE (379.4 ± 356.3) compared to L-PE (112.3 ± 77.7) and GH (38.4 ± 34.8), with significant differences in all cases ($p < 0.001$) (Table 2).

When the correlation test was performed, it turned out to be not significant between sFlt-1 and Sr ($r = 0.14$, $p = 0.10$), PlGF and Sr ($r = -0.13$, $p = 0.10$) or between sFlt-1/PlGF ratio and Sr ($r = 0.05$, $p = 0.56$).

3.8. Uric acid concentrations

Uric acid levels were within the established reference interval for pregnant women (2.4–4.9 and 3.1–6.3 mg/dL for 2nd and 3rd trimester, respectively, [27]) except in E-PE (6.4 ± 1.7 mg/dL), where UA was significantly higher than in 2TC + 3TC (3.6 ± 0.8 mg/dL, $p < 0.0001$) and in 2TC + GH (3.9 ± 1.2 mg/dL, $p < 0.0001$). Uric acid levels were also significantly higher in L-PE compared to 3TC + GH (5.6 ± 1.0 vs. 4.3 ± 1.0 , $p < 0.0001$). The levels of UA in the 1st trimester of pregnancy were significantly higher in 1T-PE when compared to 1T non-PE (3.2 ± 0.6 vs. 2.8 ± 0.7 mg/dL, $p < 0.001$) (Table S2, Supplementary data). Uric acid levels were significantly higher in the samples closest to delivery than in the 1st trimester for all pregnant women (5.2 ± 1.4 vs. 3.08 ± 0.7 mg/dL, $p < 0.0001$).

There was a significant positive correlation in PE-ss between UA and Sr ($r = 0.67$, $p < 0.0001$), which was stronger in E-PE ($r = 0.80$, $p < 0.0001$) than in L-PE ($r = 0.55$, $p < 0.0001$), (Fig. S2, Supplementary data).

3.9. Oxidative stress status

Lipid peroxidation was found to be the highest in L-PE (94.9 ± 64.9 nmol MDA + 4HNE/g prot.), but there were no significant differences when compared with the other groups (78.5 ± 25.8 , 71.8 ± 39.4 and 91.2 ± 68.2 , for E-PE, GH and 3TC, respectively, $p > 0.05$) (Table 3). E-PE showed the lowest values of TAA (2.1 ± 1.2 mg Tx/g prot.), but no significant differences were found when compared with the other groups (3.3 ± 1.5 , 4.1 ± 2.8

and 4.2 ± 5.0 , for L-PE, GH and 3TC, respectively, $p > 0.05$). When calculating the lipid peroxidation/TAA ratio, it was found to be significantly higher in E-PE (46.0 ± 25.0) compared to GH (23.3 ± 16.4 , $p < 0.05$). No significant differences were found in the 1st trimester of gestation between 1T-PE and 1TC in lipid peroxidation (84.1 ± 51.6 vs. 108.4 ± 77.1 , $p > 0.05$), TAA (5.5 ± 1.4 vs. 7.3 ± 3.7 , $p > 0.05$) or lipid peroxidation/TAA ratio (15.5 ± 8.7 vs. 18.3 ± 18.4 , $p > 0.05$). Lipid peroxidation/TAA ratio in all groups is shown in Fig. S3, Supplementary data.

When correlations between oxidative stress parameters and gestational week of sampling were performed, we found a different trend between preeclamptic (1T-PE, E-PE and L-PE) and non-preeclamptic women (1TC, GH and 3TC), as in the former case a stronger and negative correlation existed between gestational week of sampling and TAA ($r = -0.64$, $p = 0.0001$ and $r = -0.40$, $p = 0.03$, for preeclamptic and non-preeclamptic women, respectively) and there was a positive correlation between gestational week of sampling and lipid peroxidation/TAA ratio ($r = 0.49$, $p = 0.006$) that does not exist in non-preeclamptic women ($r = 0.25$, $p = 0.18$).

When correlations were performed, we found in preeclamptic women significant associations between TAA and Sr ($r = -0.54$, $p = 0.002$) and between lipid peroxidation/TAA ratio and Sr ($r = 0.47$, $p = 0.008$), with these correlations being non-significant in non-preeclamptic women ($r = -0.02$, $p = 0.9$ and $r = -0.18$, $p = 0.33$, respectively).

3.10. Discussion

To our knowledge, this is the first study in which Sr serum levels are measured in patients with PE, been E-PE and L-PE clearly differentiated. Strontium levels at the beginning of pregnancy and the evolution of this biomarker in a subset of patients were also evaluated.

Concentrations of serum Sr in preeclamptic pregnant women were found to be significantly higher than in healthy pregnancies, with this difference being greater in E-PE. These results are consistent with those showed in a previously study [15], where higher Sr concentrations in pregnant women with PE were found when compared to healthy pregnancies. These authors also found a correlation between Sr and clinical parameters and with soluble endoglin, a biomarker of PE,

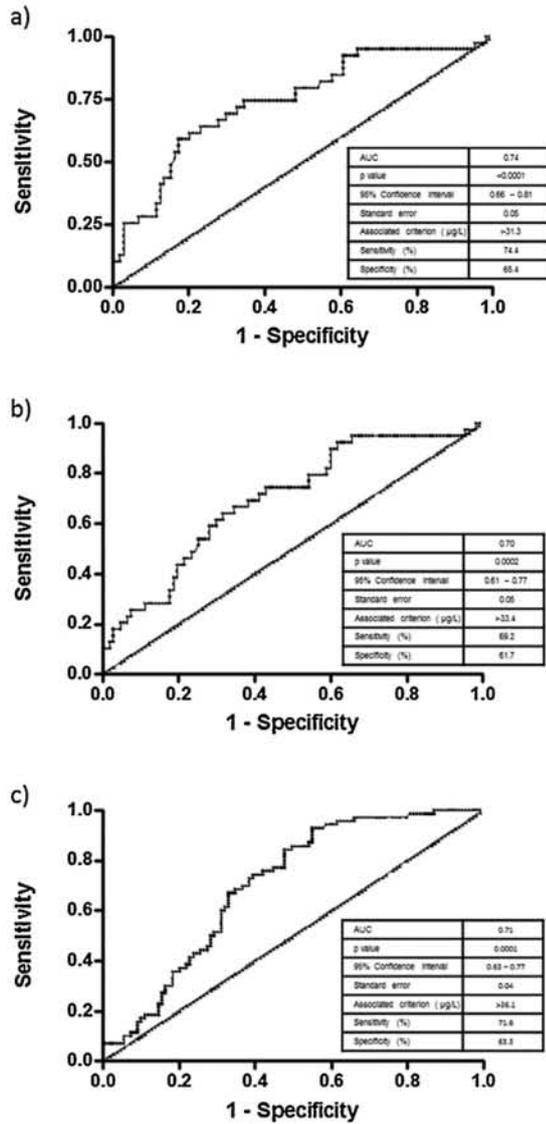


Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) curves for the diagnostic of PE in pregnant women using Sr as biomarker when the groups compared are E-PE vs. C2T + C3T (a), E-PE vs. C2T + GH (b) and L-PE vs. C3T + GH (c).

suggesting that Sr can take part in the pathophysiology of the illness. According to the results of our previous study [20], Sr remains unchanged until the 3rd trimester in healthy pregnant women, when it

rises slightly. This may explain why Sr shows a better diagnostic value in E-PE than in L-PE, where Sr levels are also elevated, but there is a higher overlapping with Sr concentrations in normal pregnancy.

Several studies have shown that preeclamptic women have decreased levels of plasmatic and urinary Ca [12,28,29], which may be related to an increased bone turnover compared to normal pregnancies, occurring only when the disease is clinically evident [30]. Because of the similarities and the existing competition between Sr and Ca in the absorption, transport and signaling pathways, we added Ca determination to establish possible relations. Although we found no significant correlation between Ca and Sr in women with PE, we did find significantly lower Ca levels in E-PE, which is in agreement with the studies mentioned above.

Vascular disorders that occur in PE involve a cardiac stress [31]. NT-proBNP is one of the fragments secreted primarily by the cardiac ventricle, and its serum concentration correlates with prognosis of ventricular failure, being used in clinical practice to assess ventricular dysfunction and for diagnosing heart failure. According to previous studies which link this peptide with the development of PE [32,33], we found that NT-proBNP is increased in preeclamptic women, being elevated in 41% of women with E-PE and exceeding the cutoff point for the diagnosis of heart failure in 33%. We also found that NT-proBNP is within reference interval in the 1st trimester of pregnancy, rising later, when symptoms of PE appear. Strontium, used as strontium ranelate, has been related to an increased risk of cardiovascular and thromboembolic events [16,17]. However, Sr levels found in patients under this treatment are, at least, 100 times higher than in normal pregnancy [34]. Moreover, other authors did not find evidence of such association [35]. Given the above, besides the fact that we found no correlation between Sr and NT-proBNP in preeclamptic women, it is unlikely that Sr influences the occurrence of heart failure in these patients.

The results found for the sFlt-1/PlGF ratio are consistent with the literature [36,37], although the mean value found in GH is slightly above the diagnostic exclusion cut-off point for PE.

Our results about UA are consistent with those reported previously, being significantly elevated in women with PE compared to controls. It is the only parameter of those studied whose levels are already significantly higher in the 1st trimester in pregnant women who will develop PE later on. In pregnancy, hyperuricemia frequently occurs before the development of hypertension and proteinuria, and has been proposed to be involved in the pathogenesis of PE [38,39]. In addition, and interestingly, UA and Sr show a strong and positive correlation in pregnancy, which is even higher in PE (especially E-PE).

The redox state was found to be higher in E-PE only when compared to GH, without finding significant differences when compared to other groups. We observe a different evolution of the oxidative stress parameters as the pregnancy progresses between preeclamptic and non-preeclamptic women, with the balance between damage and defense being less favorable in PE than in healthy pregnant women. Therefore, there is an oxidative stress component that increases more strongly and

Table 3
Oxidative stress parameters measured in a subset of participants (mean ± SD).

	1T-PE n = 10	1TC n = 10	E-PE n = 10	L-PE n = 10	GH n = 10	3TC n = 10
Gestational week of extraction	10.4 ± 0.3	10.6 ± 0.7	30.0 ± 4.1	36.8 ± 2.3	35.7 ± 5.2	38.7 ± 1.6
Lipid peroxidation (nmol MDA + 4HNE/g prot.)	84.1 ± 51.6	108.4 ± 77.1	78.5 ± 25.8	94.9 ± 64.9	71.8 ± 39.4	91.2 ± 68.2
TAA (mg Tx/g prot.)	5.5 ± 1.4	7.3 ± 3.7	2.1 ± 1.2	3.3 ± 1.5	4.1 ± 2.8	4.2 ± 5.0
Lipid peroxidation/ TAA ratio	15.5 ± 8.7	18.3 ± 18.4	46.0 ± 25.0	32.7 ± 25.6	23.3 ± 16.4	28.7 ± 18.1
P values	1T-PE vs. 1TC		E-PE vs. L-PE		GH vs. 3TC	
Lipid peroxidation	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TAA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Lipid peroxidation/ TAA ratio	ns	ns	ns	*	ns	ns

1T-PE, preeclamptic pregnant women in the 1st trimester; 1TC, 1st trimester control group; E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; 3TC, 3rd trimester control group; TAA, total antioxidant activity. *p < 0.05, ns = non-significant.

significantly as the disease progresses than when the disease does not exist. Previous studies found decreased antioxidant activity and/or increased oxidative damage in pregnancies with PE [5,10,11]. In fact, it is recognized that endothelial damage in PE is mediated by oxidative stress imposed by increased generation of oxygen free radicals or a fall in antioxidant levels [3].

We found a strong correlation between Sr and TAA and Sr and the lipid peroxidation/TAA ratio in preeclamptic women, which we did not find in non-preeclamptic women. This suggests that the disease makes Sr and the body's oxidative status fluctuate more closely, as did Sr and UA. There is growing evidence about the effects of UA on oxidative stress [40–42]. On the other hand, several studies have showed a relationship between Sr and oxidative stress [43–47], suggesting that Sr has a scavenging effect on lipid peroxidation, playing a preventive role in oxidative damage. Taking into account the above, the link between both parameters is probably the oxidative stress. As we suggested in our previous study [20], Sr levels rise when some kind of oxidative damage exists, and this elevation attempts in some way to restore the balance between the body's defense and its oxidative damage.

Some of the limitations of our study are, first, that the population size of each subgroup is very small ($n = 10$), which is the probable cause that explains that the differences are not significant except when comparing E-PE to GH. Secondly, we do not have a control subgroup in the 2nd trimester to compare with E-PE, which would be more correct according to the gestational week of extraction. Therefore, oxidative stress in E-PE is compared to control samples belonging to a later moment in pregnancy (GH and 3TC), which is not entirely appropriate, since according to a previous study, oxidative stress increases physiologically in the 3rd trimester of healthy pregnancy.

The molecular mechanisms of Sr involve several signaling pathways, including the OPG/RANKL/RANK system. In this system, Sr increases OPG protein and decreases RANKL mRNA and protein levels in osteoblasts [48–53]. OPG has been identified as a possible useful serum marker of vascular disease [54], being a potential pro-angiogenic factor which acts as an important factor in protecting vascular endothelial cells [55–57]. Several studies provide evidence for an involvement of this system in PE [18,58], showing higher levels of OPG in pregnancies with PE compared to control pregnancies, concluding that OPG might be closely correlated to the pathogenesis of PE.

Whatever the role of Sr in the pathophysiology of the disease is, its levels may increase due to the oxidative damage generated in this pathology, with its involvement in the disease still unknown.

4. Conclusion

The higher levels of Sr found in preeclamptic pregnant women cannot be explained by decreased levels of Ca or a relationship with cardiovascular damage. The high redox status found in PE which correlates with Sr levels and the strong correlation between UA and Sr suggest that this trace element may be involved in oxidative stress, perhaps playing a protective role through its molecular targets of signaling. Further studies are needed to clarify the role of Sr in PE and its pathogenesis.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

We thank all the women who participated in the study. Thanks to Ana I. Escudero (Obstetrics and Gynecology Service, HUCA) for helping

with the diagnoses and medical records. Thanks also to Indira Álvarez Fernández for her help with the sample biobank and to the staff of the Emergency Biochemistry Laboratory of HUCA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.003>.

References

- [1] J. Brodzski, T. Lanne, R. Laurini, H. Strevens, D. Wide-Svensson, K. Marsal, Vascular mechanical properties and endothelial function in pre-eclampsia with special reference to bilateral uterine artery notch, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 87 (2) (2008) 154–162.
- [2] K. Watanabe, T. Mori, A. Iwasaki, C. Kimura, H. Matsushita, K. Shinohara, A. Wakatsuki, Increased oxidant generation in the metabolism of hypoxanthine to uric acid and endothelial dysfunction in early-onset and late-onset preeclamptic women, *J. Maternal-Fetal Neonatal Med.* 25 (12) (2012) 2662–2666.
- [3] C.A. Hubel, J.M. Roberts, R.N. Taylor, T.J. Musci, G.M. Rogers, M.K. McLaughlin, Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161 (4) (1989) 1025–1034.
- [4] G.J. Burton, E. Jauniaux, Oxidative stress, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25 (3) (2011) 287–299.
- [5] N. Hilali, A. Kocyyigit, M. Demir, A. Camuzcuoglu, A. Incebiyik, H. Camuzcuoglu, M. Vural, A. Taskin, DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 170 (2) (2013) 377–380.
- [6] E.A. Steegers, P. von Dadelszen, J.J. Duvekot, R. Pijnenborg, Pre-eclampsia, *Lancet* 376 (9741) (2010) 631–644.
- [7] M. Silasi, B. Cohen, S.A. Karumanchi, S. Rana, Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia, *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 37 (2) (2010) 239–253.
- [8] S. Ziaei, K.M. Bonab, A. Kazemnejad, Serum lipid levels at 28–32 weeks gestation and hypertensive disorders, *Hypertens. Pregnancy* 25 (1) (2006) 3–10.
- [9] D. Rumiris, Y. Purwosunu, N. Wibowo, A. Farina, A. Sekizawa, Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status, *Hypertens. Pregnancy* 25 (3) (2006) 241–253.
- [10] Y. Atamer, Y. Kocyyigit, B. Yokus, A. Atamer, A.C. Erden, Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 119 (1) (2005) 60–66.
- [11] R. Negi, D. Pande, K. Karki, A. Kumar, R.S. Khanna, H.D. Khanna, Trace elements and antioxidant enzymes associated with oxidative stress in the pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation, *Clin. Nutr.* 31 (6) (2012) 946–950.
- [12] L. Farzin, F. Sajadi, Comparison of serum trace element levels in patients with or without pre-eclampsia, *J. Res. Med. Sci.* 17 (10) (2012) 938–941.
- [13] M.S. Sarwar, S. Ahmed, M.S. Ullah, H. Kabir, G.K. Rahman, A. Hasnat, M.S. Islam, Comparative study of serum zinc, copper, manganese, and iron in preeclamptic pregnant women, *Biol. Trace Elem. Res.* 154 (1) (2013) 14–20.
- [14] F. Ranjkesh, H.K. Jaliseh, S. Abutorabi, Monitoring the copper content of serum and urine in pregnancies complicated by preeclampsia, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (1–3) (2011) 58–62.
- [15] V.B. Rezende, F. Barbosa, A.C. Palei, R.C. Cavalli, J.E. Tanus-Santos, V.C. Sandrim, Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 130–135.
- [16] B. Abrahamson, E.L. Grove, P. Vestergaard, Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate, *Osteoporos. Int.* 25 (2) (2014) 757–762.
- [17] V. Osborne, D. Layton, M. Perrio, L. Wilton, S.A. Shakir, Incidence of venous thromboembolism in users of strontium ranelate: an analysis of data from a prescription-event monitoring study in England, *Drug Saf.* 33 (7) (2010) 579–591.
- [18] P. Shen, Y. Gong, T. Wang, Y. Chen, J. Jia, S. Ni, B. Zhou, Y. Song, L. Zhang, R. Zhou, Expression of osteoprotegerin in placenta and its association with preeclampsia, *PLoS One* 7 (8) (2012) e44340.
- [19] Hypertension in pregnancy. Report of the American college of obstetricians and gynecologists' task force on hypertension in pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 122 (5) (2013) 1122–1131.
- [20] E.M.-M.C. Barneo-Caragol, S. Rodríguez-González, P. Lequerica-Fernández, I. Vega-Naredo, F.V. Álvarez Menéndez, Strontium and oxidative stress in normal pregnancy, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45 (2018) 57–63.
- [21] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [22] D. Gerard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Regnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, J. Chaudiere, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (10) (1998) 1176–1183.
- [23] M.B. Arnao, A. C. M. Acosta, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* 73 (2001) 6.
- [24] D. de Gonzalo-Calvo, K. Neitzert, M. Fernandez, I. Vega-Naredo, B. Caballero, M. Garcia-Macia, F.M. Suarez, M.J. Rodriguez-Colunga, J.J. Solano, A. Coto-Montes, Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and

- IL-6 as possible biomarkers, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (5) (2010) 733–737.
- [25] C.a.L.S. Institute, User Verification of Performance for Precision and Trueness, Approved guideline, 2006 (pp. EP15-A2).
- [26] J.L. Januzzi, R. van Kimmenade, J. Lainchbury, A. Bayes-Genis, J. Ordóñez-Llanos, M. Santalo-Bel, Y.M. Pinto, M. Richards, NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the international collaborative of NT-proBNP study, *Eur. Heart J.* 27 (3) (2006) 330–337.
- [27] M. Abbassi-Ghanavati, L.G. Greer, F.G. Cunningham, Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians, *Obstet. Gynecol.* 114 (6) (2009) 1326–1331.
- [28] L. Sanchez-Ramos, S. Sandroni, F.J. Andres, A.M. Kaunitz, Calcium excretion in preeclampsia, *Obstet. Gynecol.* 77 (4) (1991) 510–513.
- [29] J.M. Belizan, J. Villar, L. Gonzalez, L. Campodonico, E. Bergel, Calcium supplementation to prevent hypertensive disorders of pregnancy, *N. Engl. J. Med.* 325 (20) (1991) 1399–1405.
- [30] A. Kumar, S.G. Devi, S. Prasad, S. Kapoor, S. Sharma, Bone turnover in pre-eclampsia-complicated pregnancy in north Indian women, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 38 (1) (2012) 172–179.
- [31] M.J. VanWijk, K. Kublickiene, K. Boer, E. VanBavel, Vascular function in pre-eclampsia, *Cardiovasc. Res.* 47 (1) (2000) 38–48.
- [32] A. Kale, E. Kale, A. Yalinkaya, N. Akdeniz, N. Canoruç, The comparison of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in preeclampsia and normotensive pregnancy, *J. Perinat. Med.* 33 (2) (2005).
- [33] K.M. Tihtonen, T. Kööbi, O. Vuolteenaho, H.S. Huhtala, J.T. Uotila, Natriuretic peptides and hemodynamics in preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196 (4) (2007) 328 (e1–328.e7).
- [34] P.J. Meunier, C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J.E. Badurski, T.D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E.M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H.K. Genant, J.Y. Reginster, The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.* 350 (5) (2004) 459–468.
- [35] C. Cooper, K.M. Fox, J.S. Borer, Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: a nested case-control study in the CPRD, *Osteoporos. Int.* 25 (2) (2014) 737–745.
- [36] S. Verloren, A. Galindo, D. Schlembach, H. Zeisler, I. Herraiz, M.G. Moertl, J. Pape, J.W. Dudenhausen, B. Denk, H. Stepan, An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202 (2) (2010) 161 (e1–161.e11).
- [37] S. Verloren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk, H. Stepan, New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia, *Hypertension* 63 (2) (2014) 346–352.
- [38] R.W. Powers, L.M. Bodnar, R.B. Ness, K.M. Cooper, M.J. Gallaher, M.P. Frank, A.R. Daftary, J.M. Roberts, Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (1) (2006) 160 (e1–160.e8).
- [39] S.A. Bainbridge, J.M. Roberts, Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia, *Placenta* 29 (2008) 67–72.
- [40] A. Many, C.A. Hubel, J.M. Roberts, Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174 (1 Pt 1) (1996) 288–291.
- [41] T.L. Hawkins, J.M. Roberts, G.J. Mangos, G.K. Davis, L.M. Roberts, M.A. Brown, Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study, *BJOG* 119 (4) (2012) 484–492.
- [42] D.C. Hooper, S. Spitsin, R.B. Kean, J.M. Champion, G.M. Dickson, I. Chaudhry, H. Koprowski, Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (2) (1998) 675–680.
- [43] S. Yalin, O. Sagir, U. Comelekoglu, M. Berkoz, P. Eroglu, Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model, *Pharmacol. Rep.* 64 (2) (2012) 396–402.
- [44] S. Lu, L. Ren, J. Fang, J. Ji, G. Liu, J. Zhang, H. Zhang, R. Luo, K. Lin, R. Fan, Trace elements are associated with urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level: a case study of college students in Guangzhou, China, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23 (9) (2016) 8484–8491.
- [45] S.M. El-Megharbel, R.Z. Hamza, M.S. Refat, Synthesis, spectroscopic and thermal studies of Mg(II) Ca(II), Sr(II) and Ba(II) diclofenac sodium complexes as anti-inflammatory drug and their protective effects on renal functions impairment and oxidative stress, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 135 (2015) 915–928.
- [46] M. B. R.P. Radzki, R. Filip, E. Albera, M. Kankofer, Effect of strontium ranelate on femur densitometry and antioxidative/oxidative status in castrated male rats, *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 36 (2) (2009) 9.
- [47] Y. Bai, W. Feng, S. Wang, X. Zhang, W. Zhang, M. He, T. Wu, H. Guo, Essential metals zinc, selenium, and strontium protect against chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2) (2016) 951–960.
- [48] Z. Saidak, P.J. Marie, Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis, *Pharmacol. Ther.* 136 (2) (2012) 216–226.
- [49] M. R-G, J.B. Cannata-Andia, C. Gómez-Alonso, Mecanismo de acción del ranelato de estroncio, *Rev. Osteoporos. Metab. Miner.* 2 (Suppl. 1) (2010) 85–89.
- [50] J.Y. Reginster, O. Bruyere, J. Collette, Strontium ranelate treatment increases osteoprotegerin serum levels in postmenopausal osteoporotic women, *Bone* 50 (5) (2012) 1201–1202 (author reply 1203–4).
- [51] S.K. Tat, J.P. Pelletier, F. Mineau, J. Caron, J. Martel-Pelletier, Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodeling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts, *Bone* 49 (3) (2011) 559–567.
- [52] G.J. Atkins, K.J. Weldon, P. Halbout, D.M. Findlay, Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response, *Osteoporos. Int.* 20 (4) (2009) 653–664.
- [53] T.C. Brennan, M.S. Rybchyn, W. Green, S. Atwa, A.D. Conigrave, R.S. Mason, Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate, *Br. J. Pharmacol.* 157 (7) (2009) 1291–1300.
- [54] M. Nybo, L.M. Rasmussen, The capability of plasma osteoprotegerin as a predictor of cardiovascular disease: a systematic literature review, *Eur. J. Endocrinol.* 159 (5) (2008) 603–608.
- [55] J.G. Emery, P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, P.R. Young, Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.* 273 (23) (1998) 14363–14367.
- [56] P.A. Price, H.H. June, J.R. Buckley, M.K. Williamson, Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D, *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc. Biol.* 21 (10) (2001) 1610–1616.
- [57] M. Kobayashi-Sakamoto, K. Hirose, M. Nishikata, E. Isogai, I. Chiba, Osteoprotegerin protects endothelial cells against apoptotic cell death induced by Porphyromonas gingivalis cysteine proteinases, *FEMS Microbiol. Lett.* 264 (2) (2006) 238–245.
- [58] N. Vitoratos, I. Lambrinouadaki, D. Rizos, E. Armeni, A. Alexandrou, G. Creatsas, Maternal circulating osteoprotegerin and soluble RANKL in pre-eclamptic women, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 154 (2) (2011) 141–145.
- [59] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biol. Trace Elem. Res.* 80 (1) (2001) 77–93.

SUPPLEMENTARY DATA:

Table S1. Parameters and number of samples assayed from the study population.

Parameters:	Sr	NT-proBNP	UA	Ca	sFlt-1	PlGF	OS
Samples closest to delivery:							
• E-PE	39	39	39	32	39	39	10
• L-PE	67	67	67	53	67	67	10
• GH	56	56	56	54	56	56	10
Samples from 1 st trimester:							
• E-PE	24	13	17	13	-	-	1
• L-PE	51	37	40	37	-	-	9
• GH	49	35	35	35	-	-	-
Samples from the previous study:							
• 1TC	50	50	50	50	-	-	10
• 2TC	51	51	42	43	-	-	-
• 3TC	53	53	53	53	-	-	10

E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; 1TC, 2TC and 3TC; 1st, 2nd and 3rd trimester control groups from a previous study [1]; Sr, strontium; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; UA, uric acid; Ca, calcium; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; PlGF, placental growth factor; OS, oxidative stress parameters.

Table S2. Strontium, calcium, NT-proBNP and uric acid serum concentrations in the first trimester of gestation in preeclamptic and non-preeclamptic pregnant women (mean \pm SD).

	1T-PE (E-PE+L-PE)	1T non-PE (GH+1TC)	<i>P</i> values (1T-PE vs. 1T non-PE)
Sr ($\mu\text{g/L}$) (21.0–100 $\mu\text{g/L}$) [2]	26.4 \pm 8.3 n=75	26.6 \pm 9.1 n=99	<i>ns</i>
Uric acid (2.0–4.2 mg/dL for the 1 st trimester) [3]	3.2 \pm 0.6 n=57	2.8 \pm 0.7 n=85	*
Calcium (2.2–2.64 mmol/L for the 1 st trimester) [3]	2.31 \pm 0.1 n=50	2.29 \pm 0.1 n=85	<i>ns</i>
NT-proBNP (<300 pg/ml) ^[4]	58.9 \pm 37.8 n=50	61.1 \pm 38.3 n=85	<i>ns</i>

1T-PE, preeclamptic pregnant women in the 1st trimester; E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; 1T non-PE, 1st trimester in non-preeclamptic pregnant women; GH, gestational hypertension; 1TC, 1st trimester control group from a previous study [1]. [^]Cut-off point for exclusion of heart failure. * $p < 0.001$, *ns* = non-significant.

Figure S1. Evolution of strontium in E-PE (a) and L-PE (b) from the first trimester throughout the pregnancy.

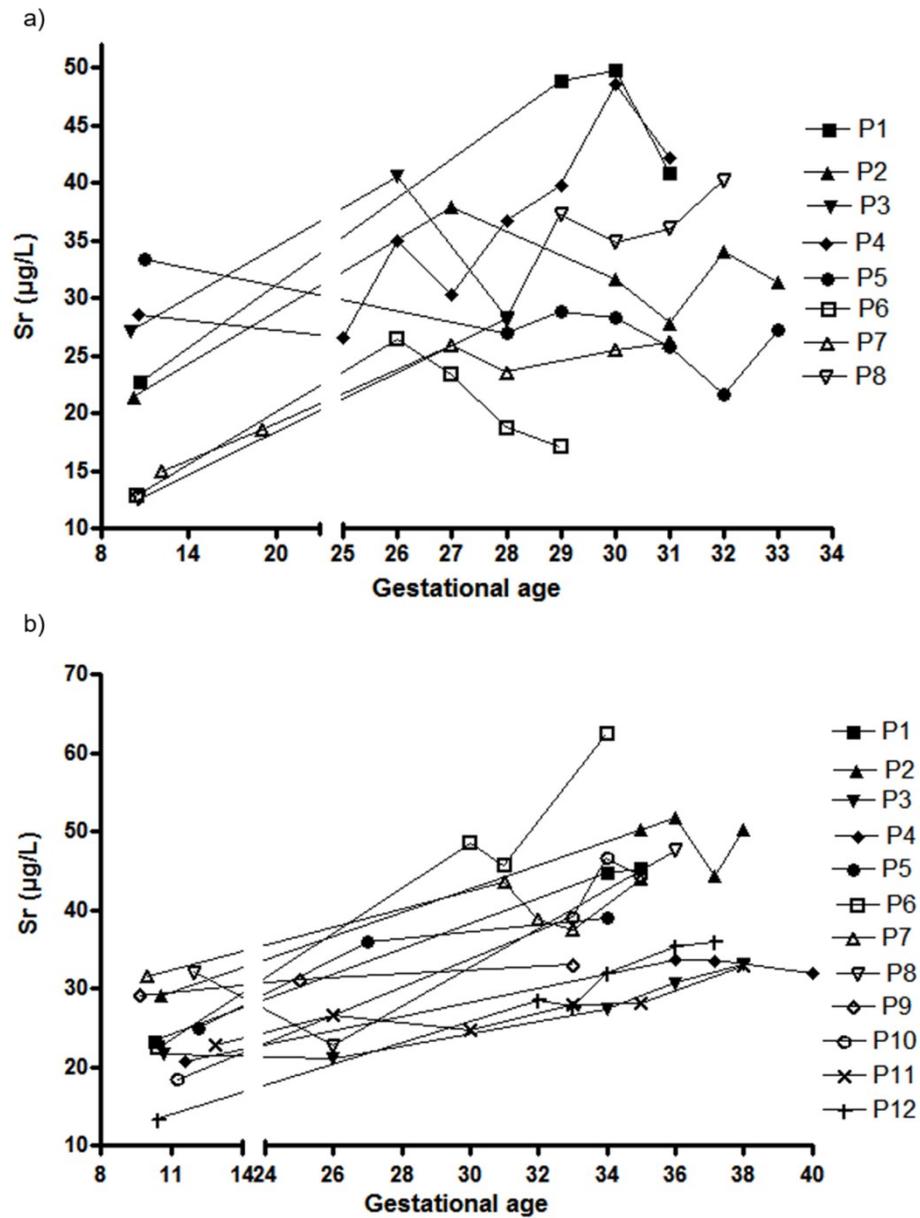


Figure S2. Correlation between Sr and UA in E-PE (a) and in L-PE (b) of serial samples.

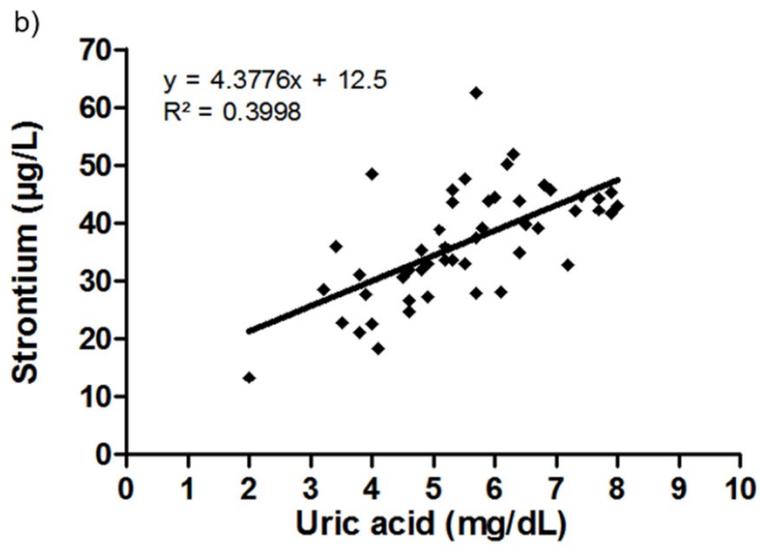
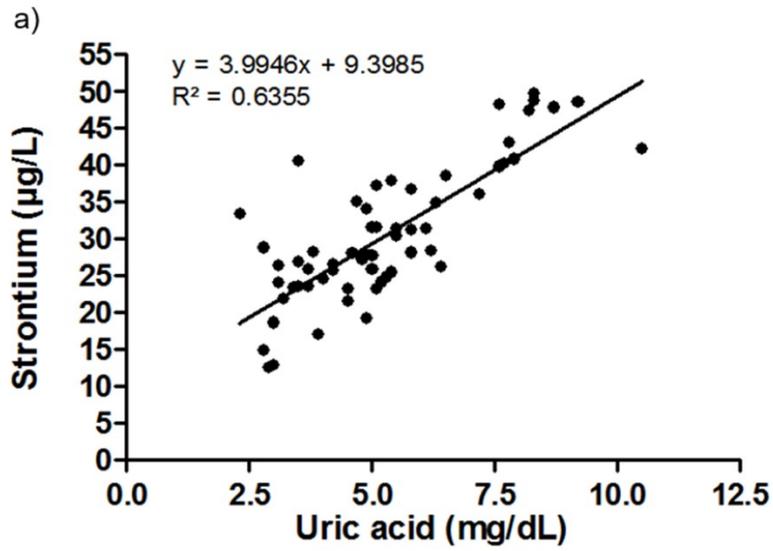
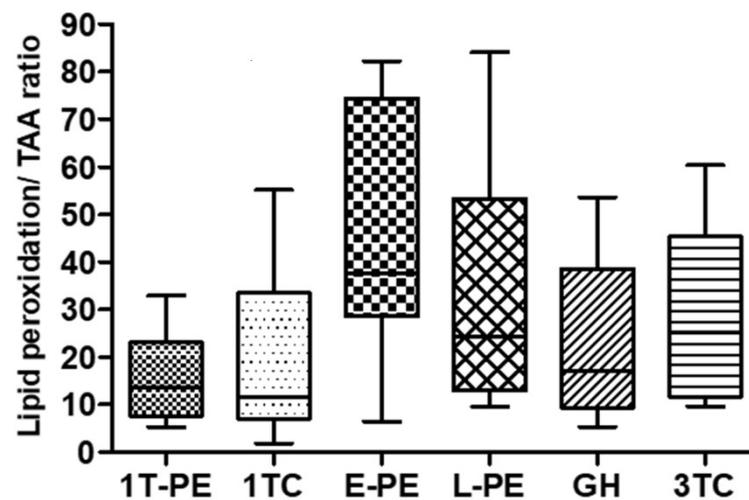


Figure S3. Lipid peroxidation/TAA ratio in a subset of participants of all groups.



1T-PE, preeclamptic pregnant women in the 1st trimester; 1TC, control pregnant women in the 1st trimester; E-PE, early-onset preeclampsia; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; 3TC, control pregnant women in the 3rd trimester.

REFERENCES:

- [1] C. Barneo-Caragol, E. Martínez-Morillo, S. Rodríguez-González, P. Lequerica-Fernández, I. Vega-Naredo, F.V. Álvarez Menéndez, Strontium and oxidative stress in normal pregnancy, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 45 (2018) 57-63.
- [2] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biol Trace Elem Res* 80(1) (2001) 77-93.
- [3] M. Abbassi-Ghanavati, L.G. Greer, F.G. Cunningham, Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians, *Obstet Gynecol* 114(6) (2009) 1326-31.
- [4] J.L. Januzzi, R. van Kimmenade, J. Lainchbury, A. Bayes-Genis, J. Ordonez-Llanos, M. Santalo-Bel, Y.M. Pinto, M. Richards, NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study, *Eur Heart J* 27(3) (2006) 330-7.

4.3 Niveles incrementados de estroncio y estatus oxidativo alterado en la preeclampsia precoz

Artículo 3: Clara Barneo-Caragol, Eduardo Martínez-Morillo, Susana Rodríguez-González, Paloma Lequerica-Fernández, Ignacio Vega-Naredo, Francisco V. Álvarez. "Increased serum strontium levels and altered oxidative stress status in early-onset preeclampsia".

Free Radical Biology and Medicine 138 (2019) 1–9

Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.001

JCR Impact Factor: 6.020; Rank: 39/293; Quartile: Q1

Publicado en mayo del 2019, es el último artículo que forma parte de esta tesis. Se estudiaron los niveles séricos de Sr como biomarcador diferencial entre la PE y otras patologías del embarazo: el CIR y la HTAG. Se compararon los niveles de Sr y estrés oxidativo en la primera muestra disponible al inicio de los síntomas, dividiéndose la población de estudio en dos grupos, según la semana gestacional de aparición (antes o después de la semana 34). Además, 5 gestantes con PEP y 9 con otras patologías fueron seriadas desde la aparición de los síntomas hasta el parto. Se evaluaron así mismo las concentraciones de Sr unas semanas antes de la aparición de los síntomas, en aquellas muestras disponibles correspondientes al cribado de la diabetes gestacional en el 2º trimestre. Se evaluaron de nuevo el ácido úrico y los factores relacionados con la angiogénesis (sFlt-1 y PlGF), y se añadió el cálculo de la tasa de función glomerular.

Contribución personal al trabajo:

- Puesta en marcha del reclutamiento de mujeres embarazadas que realizaron el cribado de la diabetes gestacional en el 2º trimestre, por medio de la comunicación del estudio al personal colaborador, así como reparto de consentimientos informados en distintas áreas de extracciones entre febrero 2016 y enero 2017, ayudada por el Dr. Martínez Morillo.

- Solicitud al Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Principado de Asturias la exención del consentimiento informado en aquellas pacientes a las que no pudo entregarse este documento, pero sí hubo muestra disponible y se utilizó para el estudio.
- Selección de participantes, en base al diagnóstico final y de no cumplimiento de criterios de exclusión (gestación múltiple). Recuperación de la muestra correspondiente al inicio de los síntomas (seroteca, ya conformada previamente, de las muestras de gestantes que acudieron al Servicio de Urgencias del HUCA con sospecha de PE) y de la muestra extraída unas semanas antes, cuando estuviera disponible (seroteca de las muestras de las gestantes del cribado de la diabetes gestacional en el 2º trimestre) para su análisis.
- Análisis de los parámetros estudiados:
 - Manejo del equipo ICP-MS para el análisis del Sr.
 - Estimación de la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) por medio de la fórmula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, colaboración epidemiológica de la enfermedad renal crónica).
- Mantenimiento de la comunicación entre el laboratorio de Bioquímica del HUCA y el laboratorio del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo. Selección de muestras con volumen suficiente y su transporte entre ambos laboratorios.
- Manejo de base de datos y consulta de las características clínicas de la población estudiada. Análisis estadísticos, elaboración de tablas y figuras y redacción del manuscrito bajo la supervisión del Dr. Martínez Morillo y del Dr. Álvarez.



Original article

Increased serum strontium levels and altered oxidative stress status in early-onset preeclampsia



Clara Barneo-Caragol^{a,*}, Eduardo Martínez-Morillo^a, Susana Rodríguez-González^b, Paloma Lequerica-Fernández^a, Ignacio Vega-Naredo^b, Francisco V. Álvarez^{a,c}

^a Laboratory of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Av. de Roma, S/n, 33011, Oviedo, Asturias, Spain

^b Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Av. Julián Clavería, S/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, C/ Fernando Bongera S/n, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

A B S T R A C T

Keywords:

Strontium
Oxidative stress
Preeclampsia
Intrauterine growth retardation
Gestational hypertension
Inductively coupled plasma-mass spectrometry

Background: Correctly distinguishing preeclampsia (PE), gestational hypertension (GH), and intrauterine growth retardation (IUGR) is a challenge for clinicians due to existing similarities. In our previous study, we showed that serum strontium (Sr) levels were elevated in preeclamptic women compared to healthy and GH pregnant women at the end of pregnancy. The main aim of this study was to evaluate Sr and oxidative stress in PE at the time of symptoms onset and before and compare it with IUGR/GH.

Methods: Samples collected at symptoms onset included 77 preeclamptic women and 72 women diagnosed with IUGR/GH divided into two groups according to the gestational extraction week (< 34 and ≥ 34). Fifteen patients were also serialized until delivery. Samples collected before symptoms onset included 140 women who developed early-onset PE (E-PE, n = 9), late-onset PE (L-PE, n = 13), IUGR (n = 9), GH (n = 32) and no pathologies (n = 77). Strontium, placental growth factor (PlGF), soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), uric acid (UA), creatinine, lipid peroxidation, and total antioxidant activity (TAA) were measured.

Results: Mean Sr, sFlt-1/PlGF ratio, UA, and lipid peroxidation/TAA ratio levels were significantly higher ($p = 0.002$, < 0.0001 , < 0.0001 and $= 0.03$, respectively) and estimated glomerular filtration rate (eGFR) and TAA significantly lower ($p = 0.0008$ and < 0.0001 , respectively) in E-PE vs other pathologies when gestational extraction week was < 34. There was a significant correlation between Sr and eGFR ($r = 0.43$, $p = 0.02$), sFlt-1/PlGF ratio ($r = 0.56$, $p = 0.002$), TAA and gestational week of sampling ($r = -0.45$, $p = 0.02$) and UA ($r = -0.82$, $p < 0.0001$) in the E-PE serial samples. No differences were found in Sr levels before symptoms onset.

Conclusion: Serum Sr concentration and oxidative status are increased in E-PE when compared to other pathologies at the time of symptoms onset. More studies are needed to elucidate the causes of Sr levels elevation and its role in the pathophysiology of PE.

1. Introduction

Preeclampsia (PE), gestational hypertension (GH), and intrauterine growth retardation (IUGR) are three pathologies of pregnancy that occur with varying degrees of severity for mother and fetus. Nutrition,

environment, genetics, oxidative stress, age, and obesity are some of the factors involved in the development of these pathologies [1,2]. It is important to differentiate between early- and late-onset disease, since they have different outcomes. Thus, early- (E-PE) and late-onset PE (L-PE) have slightly different pathophysiological mechanisms, being

Abbreviations: 4-HNE, 4-hydroxynonenal; ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid; BMI, body mass index; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; eGFR, estimated glomerular filtration rate; E-IUGR, early-onset intrauterine growth retardation; E-PE, early-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectrometry; IUGR, intrauterine growth retardation; L-IUGR, late-onset intrauterine growth retardation; L-PE, late-onset preeclampsia; MDA, malondialdehyde; PE, preeclampsia; PlGF, placental growth factor; ROC, receiver operating characteristic; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; Sr, strontium; TAA, total antioxidant activity; UA, uric acid

* Corresponding author. Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma, s/n, 33011, Oviedo, Asturias, Spain.

E-mail addresses: clara.barneo@sespa.es (C. Barneo-Caragol), edumartinezmorillo@gmail.com (E. Martínez-Morillo), rodriguezgsusana@gmail.com (S. Rodríguez-González), palomalequerica@gmail.com (P. Lequerica-Fernández), vegaignacio@uniovi.es (I. Vega-Naredo), falvarezmen@gmail.com (F.V. Álvarez).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.001>

Received 22 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 1 May 2019

Available online 02 May 2019

0891-5849/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

considered as two different entities [3,4] with different biochemical markers, genetic and environmental risk factors, prognosis, heritability, and clinical features [5–7]. Likewise, IUGR has a different phenotypic expression, evolution, and outcome when it starts early in pregnancy [8]. Correctly distinguishing one disease from another is often a challenge for clinicians due to existing similarities. Preeclampsia shares the condition of hypertension in addition to many risk factors with GH [1] and placental insufficiency with IUGR [9].

Trace elements and redox status have been widely studied in complicated pregnancies, where oxidative stress seems to be potentiated against a detriment of antioxidant defense [10,11]. Strontium (Sr) has recently been associated with the pathophysiology of PE [12], and we showed in our previous study [13] that serum Sr levels are elevated in preeclamptic women compared to healthy pregnant women or with GH at the end of pregnancy.

The aims of this study were: i) to evaluate the Sr's utility to differentiate PE from IUGR/GH at the time of symptoms onset or before, ii) to evaluate and compare other parameters such as uric acid (UA), estimated glomerular filtration rate (eGFR), and oxidative stress status in these pathologies of pregnancy, establishing possible associations with Sr levels.

2. Material and methods

2.1. Study population

Samples collected at the time of symptoms onset: serum samples from pregnant women who came to the Emergency Room of Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) with suspected PE, later confirmed or otherwise diagnosed with other complications of pregnancy, were collected between February 2015 and January 2018. Multiple gestations ($n = 16$) were excluded. In total, 77 women diagnosed with PE (28 E-PE and 49 L-PE) and 72 with other pathologies (37 IUGR and 35 GH) were included in this group ($n = 149$). Only the first sample collected at the onset of symptoms was used. Fifteen patients who had several samples collected throughout pregnancy were selected (4 E-PE, 1 E-PE&IUGR, 6 E-IUGR, 2 L-PE, and 2 GH) to be serialized, the

so-called “serial samples group” (Fig. 1).

Samples collected before symptoms onset: A follow-up of the pregnant women who underwent the screening test for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) between the gestational weeks 24–28 at HUCA was carried out between February 2016 and January 2017. Once the women gave birth, samples from those patients who developed PE, IUGR, or GH during pregnancy and a similar number of samples from healthy pregnant women were randomly selected and recovered for analysis. Thus, three groups were created: E-PE (with or without added IUGR, $n = 9$), other pathologies (early-onset IUGR (E-IUGR), L-PE, L-PE&IUGR, late-onset IUGR (L-IUGR), and GH, $n = 54$), and healthy pregnant women ($n = 77$) (Fig. 1).

2.2. Clinical definitions

Preeclampsia was diagnosed according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) definition [14]. Hypertension was defined as blood pressure $\geq 140/90$ mmHg on two separate occasions (≥ 24 h apart). Proteinuria was defined as either ≥ 300 mg of protein per 24-h urine collection or a protein/creatinine ratio of ≥ 30 mg/mmol. In the absence of proteinuria, PE was defined as new-onset hypertension with any of the following: thrombocytopenia ($< 100,000$ platelets/ μL), renal insufficiency (creatinine > 1.1 mg/dL), impaired liver function, pulmonary edema, or cerebral or visual symptoms. Preeclampsia was considered severe if one or more of these findings were present: systolic blood pressure ≥ 160 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 110 mmHg on two occasions at ≥ 4 h apart while the patient is on bed rest, platelet count $< 100,000$ per mm^3 , elevated liver enzymes, renal insufficiency or oliguria, pulmonary edema or cyanosis, new-onset cerebral or visual disturbances, severe persistent right upper quadrant, or epigastric pain [15]. Diagnosis of IUGR was estimated as fetal weight below the 10th percentile due to a pathological process that inhibits the expression of the normal growth potential, being demonstrated after 22 weeks of gestation with oligohydramnios (amniotic fluid index < 10 th percentile) or Doppler ultrasonography pulsatility index of the umbilical artery > 95 th percentile. Preeclampsia and IUGR were both classified according to the onset of symptoms: before (E-PE

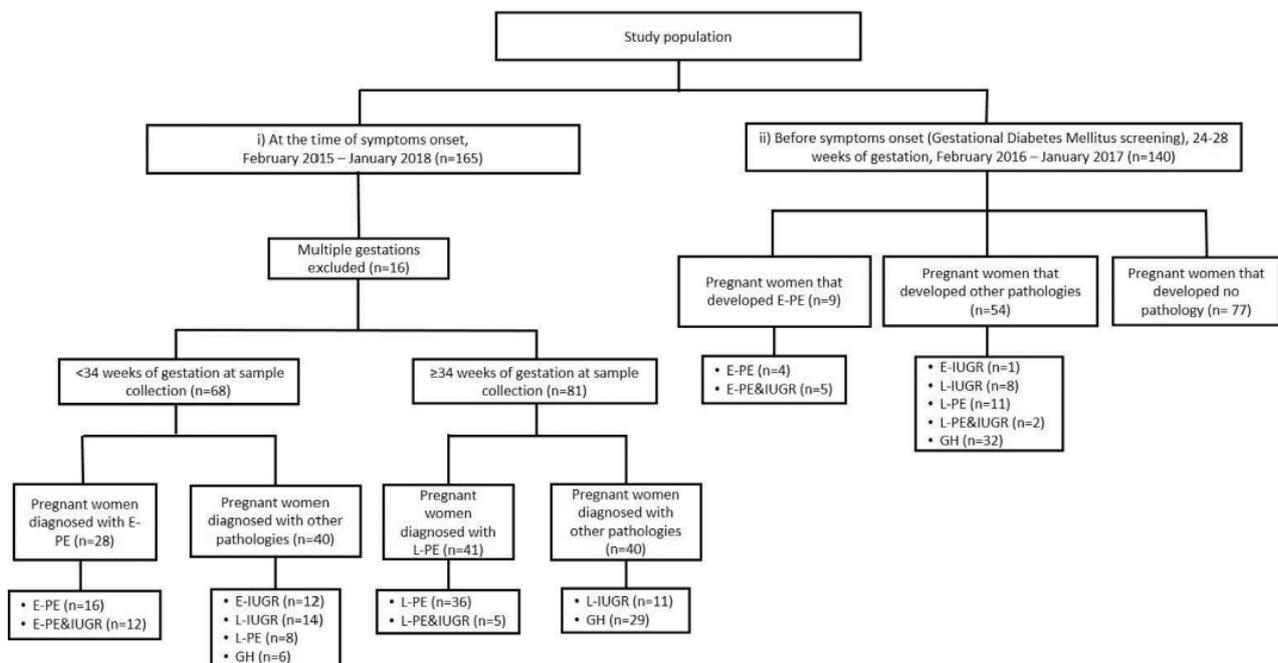


Fig. 1. The two groups of the study population according to the time of sampling (at the time of symptoms onset or before).

and E-IUGR) or after (L-PE and L-IUGR) gestational week 34. Final outcomes were reviewed by an independent obstetrician and were assessed after delivery.

Body mass index was calculated as follows: $BMI = \text{weight (in kg)} / \text{height}^2 \text{ (in m)}$. The anthropometric status for pregnant women was classified into three subgroups according to the BMI cutoff values [16]: normal ($18.5 \leq BMI < 25$), overweight ($25 \leq BMI < 30$), and obesity ($BMI \geq 30$). The BMI data were only considered when obtained within three days of serum samples collection and before the delivery date.

The renal function was estimated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine-based formula for eGFR [17].

Clinical data from all participants, including maternal age, gestational week of sampling and delivery, maternal BMI, newborn's weight (kg), and type of delivery were collected from their medical records by using the software products Cerner Millennium® and GestLab®.

2.3. Collection of serum samples

Blood samples were collected in BD Vacutainer® red top tubes with no additives and serum was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. Uric acid, creatinine, PlGF, and sFlt-1 were measured at the Emergency Biochemistry Laboratory of HUCA in the serum of pregnant women who came to the Emergency Room with suspected PE. Glucose for the O'Sullivan test for GDM screening was measured at the Routine Biochemistry Laboratory of HUCA. Leftover serum samples were aliquoted, encoded, and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until the subsequent Sr levels analysis. When enough volume was left, redox status was evaluated by measuring lipid peroxidation and total antioxidant activity (TAA) at the Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo.

2.4. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method and sample preparation

Serum samples were diluted 1:20 with an alkaline working solution with 1% ammonium hydroxide, 0.05% EDTA, 0.05% Triton X-100, 4% butan-1-ol, and 20 µg/L of internal standard (^{72}Ge) prior to analysis. Measurements were performed in triplicate using an ICP-MS 7700x from Agilent Technologies®. The limit of the quantification and calibration range for Sr (6-point calibration) was 5 (0–80) µg/L. The mean Sr level obtained in a pool of serum samples (used as internal quality control) was 29.3 µg/L. Imprecision ($< 5\%$), bias, ($< 3\%$) and total error ($< 8\%$) were in agreement with those previously obtained [18].

2.5. Spectrophotometry and electrochemiluminescence immunoassay methods

Uric acid and creatinine levels were determined on the automated autoanalyzer Cobas c601 (Roche Diagnostics, Germany) by a spectrophotometric assay (Elecsys®). The measuring intervals were 0.2–25 and 0.17–24.9 mg/dL for UA and creatinine, respectively. The coefficients of variation were $\leq 1.6\%$ and $\leq 3.5\%$ for UA and creatinine, respectively. The lower detection limits were 0.2 and 0.17 mg/dL for UA and creatinine, respectively.

PlGF and sFlt-1 concentrations were measured by an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA, Elecsys®) on the automated immunoanalyzer Cobas e601 (Roche Diagnostics, Germany). The measuring intervals were 3–10000 and 10–85000 pg/mL for PlGF and sFlt-1, respectively. The coefficients of variation were $\leq 4.6\%$ and $\leq 5.6\%$ for PlGF and sFlt-1, respectively. The lower detection limits for PlGF and sFlt-1 were 3 and 10 pg/mL, respectively.

2.6. Redox status determination

The lipid peroxidation was used as an indicator of oxidative damage. This process leads to the production of lipid peroxides and its derivative end-products malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) that provide a convenient rate of lipid peroxidation [19,20]. MDA and 4-HNE content was determined using the 1-methyl-2-phenylindole method, based on the condensation of the chromogenic agent 1-methyl-2-phenylindole with MDA and 4-HNE [21]. Briefly, a standard curve of MDA was prepared by hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. A volume of 200 µl of sample/standard were mixed in glass tubes with 650 µl of 1-methyl-2-phenylindole (10.3 mM) diluted in a 3:1 solution of acetonitrile to methanol. Reaction was initiated by the addition of 150 µl methanesulfonic acid (15.4 M). Glass tubes were shaken, incubated 40 min at 50 °C and kept on ice for 15 min. Then, samples and standards were centrifuged at 10000 g for 5 min at 4 °C. Finally, 200 µl of supernatant was transferred to a 96-well plate and read at 586 nm. The results were expressed as nmol MDA + 4-HNE/g protein.

The TAA was determined using the ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) cation radical ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) method [22] modified for blood samples [23]. The ABTS cation radical were freshly prepared by mixing 50 mM ABTS, 1 mM horseradish peroxidase and 10 mM H_2O_2 in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. The solution was shaken and kept in darkness for 3–4 h at 4 °C to stabilize the radical. The determination of TAA was made by measuring the decrease in absorbance at 730 nm induced by the addition of the sample to the reaction medium containing the preformed and stabilized $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Briefly, 10 µl of sample was mixed with 240 µL of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution in a 96-well plate that was read in darkness at 730 nm for 15 min. The difference between the initial and final value (0 and 15 min) of absorbance was used as index of TAA. The results obtained were transformed into Trolox equivalents (mg Trolox/g protein) taking into an account that the extinction coefficient of the ABTS radical at 730 nm is $12947\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 1 mol Trolox reacts with 2 mol of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and the molecular weight of Trolox is 250.29 g/mol.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with MedCalc® 12.5.0. Continuous and discrete variables were expressed as means and standard deviations and as numbers or percentages, respectively. Normal distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. When the data did not follow a normal distribution, the variables were expressed as median and interquartile range. For the outlier's detection, the Generalized Extreme Studentized Deviate (ESD) was performed (α level = 0.05). The chi-square test was used for categorical data. Student's t and Welch tests or the Mann-Whitney test were used for comparison between two independent groups of samples. Analysis of variance (ANOVA) or Kruskal Wallis tests were used to compare three or more independent groups of samples. The evolution and correlations between parameters were calculated with serial samples data (except BMI and days for delivery, which were calculated with the symptoms onset data) by the Pearson or Spearman's correlation coefficients. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to diagnose E-PE was performed to determine the optimal cut-off value for Sr, sFlt-1/PlGF ratio, or both combined. To obtain the different points of the latter, a multivariate linear regression analysis between Sr and the sFlt-1/PlGF ratio was used. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

2.8. Ethics

Ethics approval was obtained from the institutional review board. The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct in

Table 1
Clinical characteristics of patients whose samples were collected at the time of symptoms onset (mean ± SD or median [interquartile range]).

	E-PE (n = 16)	E-PE&IUGR (n = 12)	E-IUGR (n = 12)	L-IUGR (n = 25)	L-PE (n = 44)	L-PE&IUGR (n = 5)	GH (n = 35)
Maternal age (years)	33.5 ± 7.2 ^a	33.7 ± 7.4 ^a	34.6 ± 6.5 ^a	33.5 ± 4.8 ^a	34.4 ± 6.4 ^a	29.6 ± 5.9 ^a	32.4 ± 4.6 ^a
Gestational week of extraction	30.3 ± 2.6 ^{ab}	29.8 ± 2.6 ^{ab}	28.3 ± 2.8 ^a	31.7 ± 4.6 ^{bc}	35.5 ± 3.7 ^d	35.0 ± 1.3 ^{cd,e}	37.7 (36.5–39.0) ^e
Gestational week of delivery	31.8 ± 2.6 ^a	31.3 ± 2.4 ^a	31.5 ± 1.9 ^a	38.4 ± 1.2 ^b	37.6 ± 1.9 ^{bc}	36.2 ± 1.4 ^c	39.4 ± 1.2 ^d
Time between extraction and delivery date (days)	10.5 ± 14.0 ^a	10.8 ± 11.8 ^{a,b}	22.3 ± 20.7 ^{bc}	46.3 ± 32.1 ^d	3.5 (2.0–12.5) ^{ac}	8.4 ± 9.8 ^{ac}	17.1 ± 20.4 ^{ac}
Maternal BMI (kg/m ²)	31.3 ± 3.1 ^a (n = 11)	26.4 ± 3.2 ^a (n = 6)	29.5 ± 8.2 ^a (n = 6)	28.1 (23.8–32.4) ^a (n = 6)	33.2 ± 6.5 ^b (n = 2)	34.8 (29.4–38.0) ^a (n = 3)	34.0 ± 7.9 ^a (n = 22)
Newborn's weight (kg)	1.68 ± 0.56 ^a (n = 15)	1.09 ± 0.26 ^b (n = 12)	1.05 ± 0.29 ^b (n = 12)	2.27 ± 0.30 ^c (n = 21)	2.73 ± 0.50 ^d (n = 39)	1.84 ± 0.30 ^e (n = 5)	3.23 ± 0.44 ^f (n = 33)
Type of delivery:							
● Spontaneous	1 (6%)	–	2 (17%)	14 (56%)	16 (36%)	2 (40%)	15 (43%)
● Instrumental	1 (6%)	–	–	5 (20%)	7 (16%)	–	13 (37%)
● Cesarean	13 (82%)	12 (100%)	10 (83%)	3 (12%)	16 (36%)	3 (60%)	5 (14%)
● Fetal demise	1 (6%)	–	–	–	–	–	–
● No data	–	–	–	3 (12%)	5 (12%)	–	2 (6%)

E-PE, early onset preeclampsia; E-PE&IUGR, early-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; E-IUGR, early-onset intrauterine growth retardation, L-IUGR, late-onset intrauterine growth retardation; L-PE, late-onset preeclampsia; L-PE&IUGR, late-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; GH, gestational hypertension; BMI, body mass index. ^{a,b,c,d,e} same letters in a row means that results did not differ significantly (p ≥ 0.05).

Table 2
Concentrations of Sr, UA, eGFR, sFlt-1/PlGF ratio, and oxidative stress parameters at the time of symptoms onset in each group (mean ± SD).

Parameters and reference intervals	EARLY GROUP (Gestational week of extraction < 34)		LATE GROUP (Gestational week of extraction ≥ 34)		P values	Pregnant women diagnosed with other pathologies (11 L-IUGR, 29 GH)	P values
	Pregnant women diagnosed with PE (16 E-PE, 12 E-PE&IUGR)	Pregnant women diagnosed with other pathologies (12 E-IUGR, 14 L-IUGR, 8 L-PE, 6 GH)	Pregnant women diagnosed with PE (36 L-PE, 5 L-PE&IUGR)	Pregnant women diagnosed with other pathologies (11 L-IUGR, 29 GH)			
Gestational week of extraction	30.1 ± 2.6 n = 28	28.8 ± 2.7 n = 40	36.7 ± 2.2 n = 41	37.7 ± 1.8 n = 40	0.06		0.02
Sr (µg/L) (21.0–100 µg/L) [52]	38.0 ± 13.1 n = 28	28.6 ± 9.2 n = 40	42.7 ± 11.2 n = 41	36.8 ± 15.7 n = 40	0.002		0.05
sFlt-1/PlGF ratio (< 33 *) [24,25]	492.4 ± 483.1 n = 28	60.5 ± 95.7 n = 40	136.6 ± 137.5 n = 41	46.9 ± 40.1 n = 40	< 0.0001		< 0.0001
Uric acid (3.1–6.3 mg/dL for 3rd trimester) [53]	6.0 ± 1.9 n = 28	3.8 ± 0.9 n = 40	5.5 ± 1.4 n = 41	4.7 ± 0.9 n = 40	< 0.0001		0.004
eGFR (CKD-EPI, mL/min/1.73m ²) (117–182 for 3rd trimester) [53]	110.0 ± 19.4 n = 28	124.7 ± 10.5 n = 39	109.7 ± 17.6 n = 41	117.4 ± 13.7 n = 40	0.0008		0.03
Lipid peroxidation (nmol MDA + 4HNE/g prot.)	122.2 ± 101.5 n = 28	141.7 ± 110.9 n = 34	133.5 ± 68.6 (n = 23)	107.0 ± 60.9 n = 22	0.48		0.18
TAA (mg Tx/g prot.)	2.3 ± 1.1 n = 28	6.7 ± 7.3 n = 32	7.4 ± 7.6 n = 23	5.1 ± 3.7 n = 22	< 0.0001		0.20
Lipid peroxidation/TAA ratio	70.0 ± 81.1 n = 28	32.0 ± 31.0 n = 32	34.9 ± 36.3 n = 23	29.8 ± 29.3 n = 22	0.03		0.88

E-PE, early-onset preeclampsia; E-PE&IUGR, early-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; E-IUGR, early-onset intrauterine growth retardation, L-IUGR, late-onset intrauterine growth retardation; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; L-PE&IUGR, late-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula; TAA, total antioxidant activity. *Cutoff value for exclusion of preeclampsia. After detection of outliers, two TAA and lipid peroxidation/TAA ratio values were eliminated.

research involving human subjects. Informed consent was obtained from the majority of participants, except in 54 patients whose blood sample for the GDM screening was obtained in a peripheral hospital. Since all these patients were treated later at HUCA for developing a pregnancy pathology, the exemption of informed consent was requested to the Ethics Committee of our institution, which was granted.

3. Results

3.1. Study population

Samples collected at the time of symptoms onset: A total of 149 patients aged from 19 to 49 years were included in this group, with a mean age of 33.5 ± 5.6 years. Appropriate BMIs were obtained from 81 participants (54%). No differences were found in maternal age or BMI between subgroups. Clinical data are contained in Table 1.

Due to the differences observed in the mean gestational week of extraction, two groups (early- and late-groups) were created for statistical comparisons among preeclamptic and non-preeclamptic women (Table 2). In the early group, L-PE was classified within the group of other pathologies, to be compared with the E-PE group. Gestational weeks of extraction were 30.1 ± 2.6 in E-PE (with or without added IUGR) vs 28.2 ± 2.7 in the rest of pathologies, $p = 0.06$. In the late group, gestational week of extraction in L-PE (with or without added IUGR) was 36.7 ± 2.2 vs 37.7 ± 1.8 in the rest of pathologies, $p = 0.02$.

The 15 patients who were serialized (number of samples = 80) had between 2 and 10 samples each, collected from 24.4 to 39.4 gestational weeks. The mean gestational week of extraction at symptoms onset and before delivery were 27.4 ± 2.7 and 33.18 ± 3.46 , respectively.

Samples collected before symptoms onset: A total of 140 patients aged from 20 to 44 years were included in this group, with a mean age of 33.5 ± 4.8 years. Mean gestational week of extraction was 25.0 ± 1.2 in all pregnant women. No significant differences in maternal age or gestational extraction week were found among groups ($p > 0.05$). Clinical data of this group is contained in Table 3.

3.2. Serum strontium concentrations

At symptoms onset: Strontium mean levels in E-PE ($38.0 \pm 13.1 \mu\text{g/L}$) were significantly higher than in other pathologies ($28.4 \pm 9.1 \mu\text{g/L}$, $p = 0.002$) in the early group (Table 2), but this difference was not significant in the late group (42.7 ± 11.2 vs $36.8 \pm 15.7 \mu\text{g/L}$, $p = 0.05$). Concentrations of each parameter according to the diagnosis in the early group are contained in Table S1. Strontium levels increased significantly throughout pregnancy in other pathologies ($r = 0.54$, $p < 0.0001$), but not in E-PE ($r = 0.26$,

$p = 0.19$). However, an ascending trend was observed in each individual patient (Fig. S1). The evolution of Sr levels in different pathologies of pregnancy is represented in Fig. 2.

Before symptoms onset: There were no significant differences in Sr levels between pregnant women who later developed E-PE ($26.9 \pm 5.5 \mu\text{g/L}$), other pathologies ($25.5 \pm 6.0 \mu\text{g/L}$), and healthy pregnancies ($26.1 \pm 7.6 \mu\text{g/L}$, $p = 0.82$) (Table 3).

Serum strontium concentrations and BMI: According to the BMI, there were no differences in Sr concentrations in normal ($39.6 \pm 7.6 \mu\text{g/L}$, $n = 9$), overweight ($36.6 \pm 12.2 \mu\text{g/L}$, $n = 23$), and obese ($39.6 \pm 14.1 \mu\text{g/L}$, $n = 49$) ($p = 0.64$) pregnant women. There was no correlation between Sr levels and BMI ($r = -0.008$, $p = 0.94$).

Severity: The degree of PE severity was established in 80.5% of preeclamptic women. Preeclampsia was considered as severe in 98.9% of the cases with E-PE vs 64.7% of cases with L-PE ($p = 0.02$). There were no differences in Sr levels in the early ($32.7 [30.0–44.8]$ vs $32.0 [23.5–39.3 \mu\text{g/L}]$, $p = 0.32$, severe and non-severe PE, respectively) and late groups (41.2 ± 9.7 vs $41.6 \pm 11.2 \mu\text{g/L}$, $p = 0.93$, severe and non-severe PE, respectively).

Days for delivery: Regardless of the patient's diagnosis, there was a significant negative correlation between Sr concentration and days for delivery in the early group ($r = -0.44$, $p = 0.0002$), resulting in the following regression equation: $y = 180.6 + -98.2 \text{ Log } (x)$, $R^2 = 0.19$ ($y =$ days between extraction and delivery date, $x =$ Sr levels). When Sr levels were $\geq 40 \mu\text{g/L}$ ($n = 14$), a significantly higher percentage of women gave birth within 15 days compared to when Sr was $< 40 \mu\text{g/L}$ ($n = 54$), (71.4 vs 33% , $p = 0.02$). There was no correlation in the late group ($r = -0.21$, $p = 0.06$).

3.3. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor ratio

The sFlt-1/PlGF ratio was significantly higher in preeclamptic women compared to pregnant women with other pathologies in the early (492.4 ± 483.1 vs 60.5 ± 95.7 , $p < 0.0001$) and late groups (136.6 ± 137.5 vs 46.9 ± 40.1 , $p < 0.0001$).

3.4. Diagnostic value of strontium and the sFlt-1/PlGF ratio at symptoms onset

When comparing E-PE ($n = 28$) with other pathologies ($n = 40$), the area under the ROC curve (AUC) was 0.76, with a significance level of $p < 0.0001$, obtaining a sensitivity of 78.6% and specificity of 70.7% for a Sr cut-off value of $> 29.4 \mu\text{g/L}$ (Fig. 3). The AUC obtained by using the sFlt-1/PlGF ratio was significantly higher (0.90, $p = 0.03$), with a sensitivity of 71.4% and specificity of 95.0%. When both parameters were combined, an AUC not significantly higher was obtained (0.91, $p = 0.79$) (Fig. 3).

Table 3

Clinical characteristics and Sr concentrations (mean \pm SD) of patients whose samples were collected before symptoms onset.

Parameters and reference intervals	Pregnant women who later developed:			
	E-PE (4 E-PE, 5 E-PE&IUGR) (n = 9)	Other pathologies (1 E-IUGR, 8 L-IUGR, 11 L-PE, 2 L-PE&IUGR, 32 GH) (n = 54)	No pathology (healthy pregnant women) (n = 77)	P values
Maternal age (years)	34.4 ± 4.5	32.5 ± 5.8	34.2 ± 3.9	0.11
Gestational week of extraction at time of O'Sullivan test	25.3 ± 2.9	25.2 ± 1.0	24.9 ± 1.0	0.44
Gestational week of delivery	32.4 ± 2.0	38.9 ± 1.7	39.7 ± 1.3	< 0.001
Type of delivery:	1 (11%)	26 (48%)	46 (60%)	0.0001
• Spontaneous	–	16 (30%)	17 (22%)	
• Instrumental	8 (89%)	12 (22%)	14 (18%)	
• Cesarean				
Sr levels (21.0–100 $\mu\text{g/L}$) [52]	26.9 ± 5.5	25.5 ± 6.0	26.1 ± 7.6	0.82

E-PE, early onset preeclampsia; E-PE&IUGR, early-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; E-IUGR, early-onset intrauterine growth retardation, L-IUGR, late-onset intrauterine growth retardation; L-PE, late-onset preeclampsia; L-PE&IUGR, late-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; GH, gestational hypertension. P values obtained with ANOVA test.

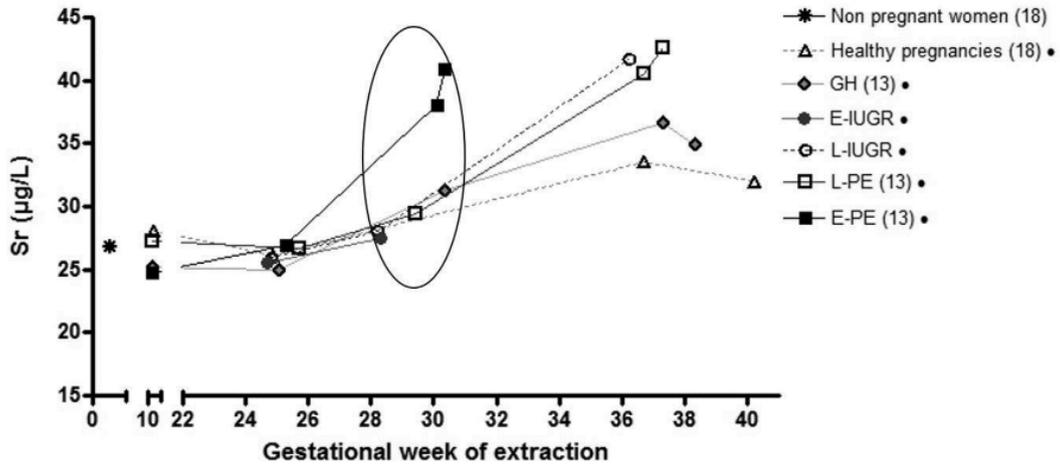


Fig. 2. Evolution of Sr levels in different pathologies of pregnancy. The data used are from the current (•) and previous studies [13,18]. Last value of healthy pregnancies corresponds to the postpartum period (± 1 day after delivery). The circle indicates the best time to discriminate E-PE from other pathologies according to Sr values.

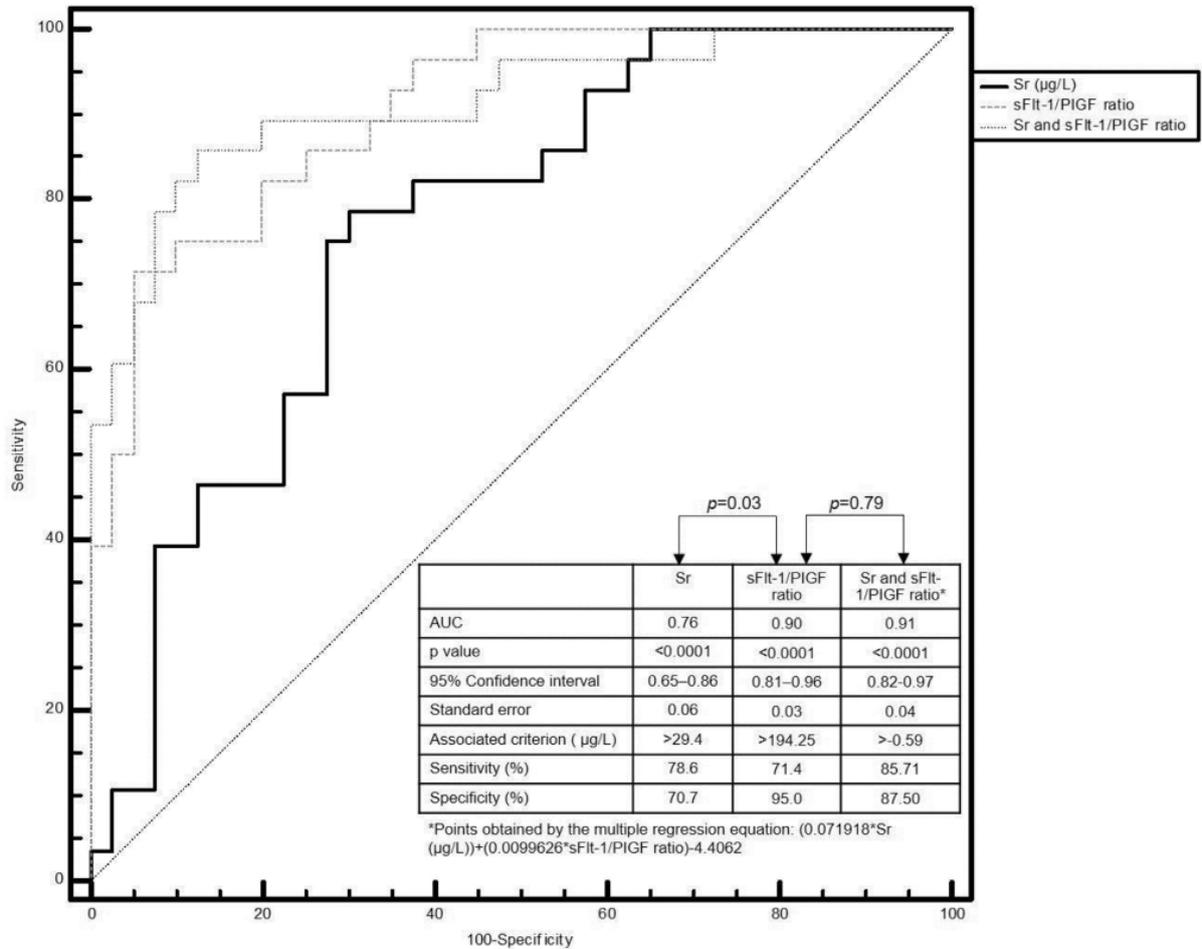


Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve for the diagnostic of E-PE with Sr levels, sFit-1/PIGF ratio, and both parameters combined, when compared with other pathologies (E- and L-IUGR, L-PE and GH), at the time of symptoms onset (gestational week of sampling < 34).

3.5. Uric acid concentrations

Uric acid levels were significantly higher in preeclamptic women compared to pregnant women with other pathologies in the early (6.0 ± 1.9 vs 3.8 ± 0.9 mg/dL, $p < 0.0001$) and late groups (5.5 ± 1.4 vs 4.7 ± 0.9 mg/dL, $p = 0.004$). An ascendant trend was observed in UA levels throughout pregnancy in E-PE ($r = 0.39$, $p = 0.04$) and in other pathologies ($r = 0.59$, $p < 0.0001$).

3.6. Estimated glomerular filtration rate

Estimated glomerular filtration rate was significantly lower in PE compared to other pathologies in the early (110.0 ± 19.4 vs 124.7 ± 10.5 , $p = 0.0008$) and late groups (109.7 ± 17.6 vs 117.4 ± 13.7 , $p = 0.03$). In E-PE, eGFR decreased significantly as the pregnancy progressed ($r = -0.56$, $p = 0.002$), but not in other pathologies ($r = -0.20$, $p = 0.19$).

3.7. Oxidative stress status

In E-PE, TAA levels were significantly lower than in other pathologies (2.3 ± 1.1 vs 6.7 ± 7.3 mg Tx/g prot, $p < 0.0001$), and lipid peroxidation/TAA ratio was significantly higher (70.0 ± 81.1 vs 32.0 ± 31.0 mg Tx/g prot, respectively, $p = 0.03$) (Table 2). No differences were found when the gestational week of extraction was > 34 . Levels of TAA decreased significantly throughout pregnancy in E-PE ($r = -0.45$, $p = 0.02$, Fig. S2), but not in other pathologies ($r = -0.20$, $p = 0.18$).

3.8. Correlation between parameters

In E-PE, a positive correlation was obtained between Sr and eGFR ($r = 0.43$, $p = 0.02$), being not significant in other pathologies ($r = -0.17$, $p = 0.27$). However, an inverse relation individually could be observed, although not statistically significant, in 12 of the 15 patients (Fig. S3).

There was a positive correlation between sFlt-1/PlGF ratio and Sr in E-PE ($r = 0.56$, $p = 0.002$, Fig. S4), but not-significant in other pathologies ($r = 0.008$, $p = 0.95$).

A significant correlation was found between TAA and UA in E-PE ($r = -0.82$, $p < 0.0001$, Fig. S5) and other pathologies ($r = -0.79$, $p < 0.0001$), and between lipid peroxidation/TAA ratio and UA in E-PE ($r = 0.47$, $p = 0.01$) and other pathologies ($r = 0.32$, $p = 0.03$).

4. Discussion

Many authors postulate that E- and L-PE are two distinct entities [3,4], the reason why we separated these two pathologies in the study design. To our knowledge, this is the first study describing and comparing Sr levels in pregnant women with PE, IUGR, and GH at the time of symptoms onset and before. The current and previous results obtained by our group [13] show that Sr levels in E-PE are significantly higher from the time of symptoms onset to delivery compared to healthy pregnant women or pregnancies with other pathologies (Fig. 2). In contrast, its levels in the first trimester of pregnancy and approximately 5 weeks before the symptoms onset are not yet increased. This fact shows that the pathophysiology of E-PE, despite starting very early in pregnancy, alters serum Sr levels only when symptoms appear. Also, Sr levels cannot be considered as a marker of disease severity.

Regardless of the diagnosis, Sr levels increase physiologically as pregnancy progresses [18]. This leads to 1) a negative correlation between Sr levels and the days for delivery, being a marker of pregnancy termination with moderate discrimination value, and 2) Sr levels showing a better diagnostic value when analyzed at the time of symptoms onset than at the end of pregnancy.

In the current study, an ascending trend of Sr levels was observed in

each individual E-PE patient, although not significant, in contrast to previous studies [13,18]: a lower samples number and the absence of the first trimester samples could be the reasons. Rezende et al. [12] also found no correlation between Sr and gestational age of sampling in the PE group, finding it however in healthy or GH pregnancies. All this suggests that, in E-PE, the elevation of Sr does not depend so much on the gestational week of sampling, but there seem to be other factors that influence its elevation, such as the pathophysiology of the disease itself.

The results found for the sFlt-1/PlGF ratio are consistent with the literature [24,25], although the mean value found in E-IUGR was above the diagnostic exclusion cut-off point for PE. This suggests that this ratio, by itself, does not seem to have enough discriminating power, hence the need to look for other markers. Thus, when Sr concentrations and the sFlt-1/PlGF ratio were combined, the diagnostic performance did not improve significantly to that obtained with the sFlt-1/PlGF ratio alone, but a considered gain of sensitivity was achieved (Fig. 3).

Our results for UA are consistent with those previously reported, being significantly elevated in women with PE compared to GH [26,27]. An elevation of UA may be the result of changes in glomerular filtration, proximal tubule function and secretion, and xanthine oxidase synthesis [28]. On the other hand, the strong inverse relationship found between UA and antioxidant defense (Fig. S5) has been postulated previously [18,29,30], suggesting that UA levels may be used as an indicator of the underlying oxidative stress in PE.

Although the mean creatinine values (data not showed) were within the normal reference range in all groups, eGFR were decreased in PE, which agrees with the literature [31,32]. Preeclampsia is a multisystem disorder that affects the renal system, where the renal plasma flow and the glomerular ultrafiltrate decrease when compared with healthy pregnancies [33,34]. Our data showed a direct relationship between eGFR and Sr levels in E-PE, but an individual inverse relationship was observed in most cases (Fig. S3). Thus, Van den Berkhof YS et al. [35] showed an independent inverse association between eGFR and Sr levels in diabetic kidney disease.

An altered oxidative status and a decreasing trend of TAA was found in E-PE, which has also been previously confirmed when comparing PE vs GH [13] and PE vs IUGR [36]. The cause for the oxidative stress is thought to be vascular, because E-PE is associated with deficient conversion of the spiral arteries [37]. On the other hand, it has been proposed that depletion of antioxidants upon free radical generation and elevation of circulating lipid peroxides may contribute to vascular endothelial cell damage, thereby compromising cellular functions in PE [38]. However, there is no definitive evidence of how the participation of free radicals influences the pathogenesis of the disease, or whether oxidative stress is the cause or the result of PE [39]. This may be due to the lack of comparative methods and, therefore, the difficulty of comparing the published data to evaluate the absolute levels of oxidative stress in vivo [40]. Although Sr has been linked to oxidative stress in many publications [18,41,42], we were not able to demonstrate these associations in the current study, so further research is needed.

The reasons why Sr levels are elevated in E-PE when compared with other pathologies still need to be elucidated. Although there is evidence of association between the BMI and some trace elements [43,44], our results confirm that this association does not occur with Sr levels. Since most of Sr is excreted by the kidneys and an altered renal function is usually present in preeclamptic women [45], this could be an explanation. On the other hand, 99% of the total amount of Sr in the body is deposited in the bone [46] and PE is characterized by increased bone turnover and resorption when compared to normal pregnancy [47,48], so this could be another reason. This is supported by the fact that a recent study [35] showed the association of plasma Sr concentrations with altered bone metabolism parameters in diabetic kidney disease, suggesting that plasmatic Sr levels are not tightly regulated and therefore may increase in circumstances of increased bone turnover. Finally, since Sr levels rise in different pathologies, including cancer [49,50], it is likely that there are one or several common underlying

processes that produce such an increase.

The main limitations of this study were, first, the small number of patients with serial samples, which has not allowed us to confirm with certainty the existing associations between the levels of Sr and the rest of the parameters. Secondly, eGFR values were calculated using the CKD-EPI equation, which is not the gold-standard method to measure renal function during gestation [51], although commonly used in routine clinical practice. And finally, being an observational study, we have not been able to elucidate the physiopathological mechanisms by which Sr and oxidative stress are involved in the disease, although the methodology and results exposed here will be useful for researchers in future studies.

5. Conclusion

Patients with E-PE showed higher Sr levels at the time of symptoms onset when compared to other pathologies, but not before. This biomarker can be considered as a marker of pregnancy termination with moderate discrimination value, but not of disease severity. Oxidative status and UA were increased and eGFR was decreased in E-PE. Further studies are needed to clarify the relation between these parameters as well as the role of Sr in the pathophysiology of PE.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

We thank all the women who participated in the study. Special thanks to Ana I. Escudero (Obstetrics and Gynecology Service, HUCA) for helping with the diagnoses and medical records, to Francisco J. Carretero for his support with statistics and to the staff of the Emergency Biochemistry Laboratory of HUCA.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.001>.

References

- [1] J. Villar, G. Carroli, D. Wojdyla, E. Abalos, D. Giordano, H. Ba'aqel, U. Farnot, P. Bergsjö, L. Bakketeig, P. Lumbiganon, L. Campodonico, Y. Al-Mazrou, M. Lindheimer, M. Kramer, Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (4) (2006) 921–931.
- [2] N. Melamed, J.G. Ray, M. Hladunewich, B. Cox, J.C. Kingdom, Gestational hypertension and preeclampsia: are they the same disease? *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 36 (7) (2014) 642–647.
- [3] P. von Dadelszen, L.A. Magee, J.M. Roberts, Subclassification of preeclampsia, *Hypertens. Pregnancy* 22 (2) (2003) 143–148.
- [4] B. Huppertz, Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis, *Hypertension* 51 (4) (2008) 970–975.
- [5] S. Hernandez-Diaz, S. Toh, S. Cnattingius, Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study, *BMJ* 338 (2009) b2255.
- [6] A.K. Wikstrom, A. Larsson, U.J. Eriksson, P. Nash, S. Norden-Lindeberg, M. Olovsson, Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia, *Obstet. Gynecol.* 109 (6) (2007) 1368–1374.
- [7] H. Stepan, A. Unversucht, N. Wessel, R. Faber, Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion, *Hypertension* 49 (4) (2007) 818–824.
- [8] S. Savchev, F. Figueras, M. Sanz-Cortes, M. Cruz-Lemini, S. Triunfo, F. Botet, E. Gratacos, Evaluation of an optimal gestational age cut-off for the definition of early- and late-onset fetal growth restriction, *Fetal Diagn. Ther.* 36 (2) (2014) 99–105.
- [9] M.L. Tjoa, C.B. Oudejans, J.M. van Vugt, M.A. Blankenstein, L.J. van Wijk, Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction, *Hypertens. Pregnancy* 23 (2) (2004) 171–189.
- [10] Y. Atamer, Y. Kocyigit, B. Yokus, A. Atamer, A.C. Erden, Lipid peroxidation, anti-oxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 119 (1) (2005) 60–66.
- [11] N. Al-Jameil, H. Tabassum, H. Al-Mayouf, H.I. Aljohar, N.D. Alenzi, S.M. Hijazy, F.A. Khan, Analysis of serum trace elements-copper, manganese and zinc in preeclamptic pregnant women by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a prospective case controlled study in Riyadh, Saudi Arabia, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (5) (2014) 1900–1910.
- [12] V.B. Rezende, F. Barbosa, A.C. Palei, R.C. Cavalli, J.E. Tanus-Santos, V.C. Sandrim, Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29 (2015) 130–135.
- [13] C. Barneo-Caragol, E. Martinez-Morillo, S. Rodriguez-Gonzalez, P. Lequerica-Fernandez, I. Vega-Naredo, F.V. Alvarez Menendez, Strontium and its role in preeclampsia, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 47 (2018) 37–44.
- [14] Hypertension in pregnancy. Report of the American College of obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 122 (5) (2013) 1122–1131.
- [15] B.M. Sibai, Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 205 (3) (2011) 191–198.
- [16] Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 894 (i-xii) (2000) 1–253.
- [17] A.S. Levey, L.A. Stevens, C.H. Schmid, Y.L. Zhang, A.F. Castro 3rd, H.I. Feldman, J.W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, T. Greene, J. Coresh, A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Ann. Intern. Med.* 150 (9) (2009) 604–612.
- [18] C. Barneo-Caragol, E. Martinez-Morillo, S. Rodriguez-Gonzalez, P. Lequerica-Fernandez, I. Vega-Naredo, F.V. Alvarez Menendez, Strontium and oxidative stress in normal pregnancy, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 45 (2018) 57–63.
- [19] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [20] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1) (1991) 81–128.
- [21] D. Gerard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Regnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, J. Chaudiere, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (10) (1998) 1176–1183.
- [22] M.B.C. Arnao, A., M. Acosta, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* 73 (2001) 6.
- [23] D. de Gonzalo-Calvo, K. Neitzert, M. Fernandez, I. Vega-Naredo, B. Caballero, M. Garcia-Macia, F.M. Suarez, M.J. Rodriguez-Colunga, J.J. Solano, A. Coto-Montes, Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (5) (2010) 733–737.
- [24] S. Verlohren, A. Galindo, D. Schlembach, H. Zeisler, I. Herraiz, M.G. Moertl, J. Pape, J.W. Dudenhausen, B. Denk, H. Stepan, An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202 (2) (2010) 161.e1–161.e11.
- [25] S. Verlohren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk, H. Stepan, New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia, *Hypertension* 63 (2) (2014) 346–352.
- [26] G. Bellomo, S. Venanzi, P. Saronio, C. Verdura, P.L. Narducci, Prognostic significance of serum uric acid in women with gestational hypertension, *Hypertension* 58 (4) (2011) 704–708.
- [27] Y. Wu, X. Xiong, W.D. Fraser, Z.C. Luo, Association of uric acid with progression to preeclampsia and development of adverse conditions in gestational hypertensive pregnancies, *Am. J. Hypertens.* 25 (6) (2012) 711–717.
- [28] R.W. Powers, L.M. Bodnar, R.B. Ness, K.M. Cooper, M.J. Gallaheer, M.P. Frank, A.R. Daftary, J.M. Roberts, Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194 (1) (2006) 160.e1–160.e8.
- [29] K. Watanabe, T. Mori, A. Iwasaki, C. Kimura, H. Matsushita, K. Shinohara, A. Wakatsuki, Increased oxidant generation in the metabolism of hypoxanthine to uric acid and endothelial dysfunction in early-onset and late-onset preeclamptic women, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 25 (12) (2012) 2662–2666.
- [30] K. Tsukimori, T. Yoshitomi, S. Morokuma, K. Fukushima, N. Wake, Serum uric acid levels correlate with plasma hydrogen peroxide and protein carbonyl levels in preeclampsia, *Am. J. Hypertens.* 21 (12) (2008) 1343–1346.
- [31] R.A. Lafayette, M. Druzin, R. Sibley, G. Derby, T. Malik, P. Huie, C. Polhemus, W.M. Deen, B.D. Myers, Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia, *Kidney Int.* 54 (4) (1998) 1240–1249.
- [32] P. Moran, P.H. Baylis, M.D. Lindheimer, J.M. Davison, Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (3) (2003) 648–652.
- [33] V.A. Lopes van Balen, T.A.G. van Gansewinkel, S. de Haas, J.J. Spaan, C. Ghossein-Doha, S.M.J. van Kuijk, J. van Drongelen, T. Cornelis, M.E.A. Spaanderman, *Kidney Function during Pregnancy: a Systematic Review and Meta-Analysis*, Ultrasound Obstet Gynecol, 2018.
- [34] S.A. Karumanchi, S.E. Maynard, I.E. Stillman, F.H. Epstein, V.P. Sukhatme, Preeclampsia: a renal perspective, *Kidney Int.* 67 (6) (2005) 2101–2113.
- [35] Y.S. van den Berkhof, C.M. Gant, R. Maatman, A. De Graaf, G.J. Navis, S.J.L. Bakker, G.D. Laverman, Correlations between plasma strontium concentration, components of calcium and phosphate metabolism and renal function in type 2 diabetes mellitus, *Eur. J. Clin. Invest.* 48 (9) (2018) e12987.
- [36] R.B. Ness, B.M. Sibai, Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195 (1) (2006)

- 40–49.
- [37] G.J. Burton, E. Jauniaux, Oxidative stress, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25 (3) (2011) 287–299.
- [38] K. Matsubara, T. Higaki, Y. Matsubara, A. Nawa, Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3) (2015) 4600–4614.
- [39] A. Taravati, F. Tohidi, Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 57 (6) (2018) 779–790.
- [40] E. Llurba, E. Gratacos, P. Martín-Gallan, L. Cabero, C. Dominguez, A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (4) (2004) 557–570.
- [41] Y. Bai, W. Feng, S. Wang, X. Zhang, W. Zhang, M. He, T. Wu, H. Guo, Essential metals zinc, selenium, and strontium protect against chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2) (2016) 951–960.
- [42] H. Jiang, Q. Guan, Y. Xiao, Z. Feng, G. Yu, Q. Pan, Strontium alleviates endoplasmic reticulum stress in a nonalcoholic fatty liver disease model, *J. Med. Food* 21 (12) (2018) 1–10.
- [43] V.O. Onukwuli, A.N. Ikefuna, A.R. Nwokocha, I.J. Emodi, C.B. Eke, Relationship between zinc levels and anthropometric indices among school-aged female children with sickle cell anemia in enugu, *Nigeria, Niger. J. Clin. Pract.* 20 (11) (2017) 1461–1467.
- [44] Q. Zhong, R. Lin, Q. Nong, Adiposity and serum selenium in U.S. Adults, *Nutrients* 10 (6) (2018).
- [45] S.A. Bainbridge, J.M. Roberts, Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia, *Placenta* 29 (2008) 67–72.
- [46] M. Pilmanc, K. Salma-Ancane, D. Loca, J. Locs, L. Berzina-Cimdina, Strontium and strontium ranelate: historical review of some of their functions, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 78 (2017) 1222–1230.
- [47] N. Anim-Nyame, S.R. Sooranna, J. Jones, J. Alagband-Zadeh, P.J. Steer, M.R. Johnson, A longitudinal study of biochemical markers of bone turnover during normal pregnancy and pregnancies complicated by pre-eclampsia, *BJOG* 109 (6) (2002) 708–713.
- [48] M. Shaarawy, S. Zaki, A.M. Ramzi, M.E. Salem, A.M. El-Minawi, Feto-maternal bone remodeling in normal pregnancy and preeclampsia, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12 (5) (2005) 343–348.
- [49] S. Wach, K. Weigelt, B. Michalke, V. Lieb, R. Stoehr, B. Keck, A. Hartmann, B. Wullich, H. Taubert, A. Chaudhri, Diagnostic potential of major and trace elements in the serum of bladder cancer patients, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 46 (2018) 150–155.
- [50] Y.V. Dumanskiy, O.V. Syniachenko, P.A. Stepko, G.S. Taktashov, O.Y. Chernyshova, O.Y. Stoliarova, The state of bone metabolism in lung cancer patients, *Exp. Oncol.* 40 (2) (2018) 136–139.
- [51] S. Park, S.M. Lee, J.S. Park, J.S. Hong, H.J. Chin, K.Y. Na, D.K. Kim, K.H. Oh, K.W. Joo, Y.S. Kim, H. Lee, Gestational estimated glomerular filtration rate and adverse maternofetal outcomes, *Kidney Blood Press. Res.* 43 (5) (2018) 1688–1698.
- [52] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biol. Trace Elem. Res.* 80 (1) (2001) 77–93.
- [53] M. Abbassi-Ghanavati, L.G. Greer, F.G. Cunningham, Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians, *Obstet. Gynecol.* 114 (6) (2009) 1326–1331.

Resultados

Table S1. Concentrations of Sr, sFit-1/PIGF ratio, UA, eGFR, and oxidative stress parameters at the time of symptoms onset according to the final diagnosis when gestational week of extraction was before 34 (mean \pm SD)

	E-PE (n=16)	E-PE&IUGR (n=12)	E-IUGR (n=12)	L-IUGR (n=14)	L-PE (n=8)	GH (n=6)
Sr ($\mu\text{g/L}$) (21.0-100 $\mu\text{g/L}$) [1]	38.0 \pm 15.8 n=16	38.0 \pm 8.8 n=12	27.4 \pm 6.1 n=12	28.0 \pm 8.1 n=14	29.4 \pm 9.9 n=8	31.3 \pm 16.2 n=6
sFit-1/PIGF ratio (<33) ^ [2,3]	508.9 \pm 593.3 n=16	470.4 \pm 303.0 n=12	156.8 \pm 128.6 n=12	10.9 \pm 13.1 n=14	33.9 \pm 28.7 n=8	19.0 \pm 33.4 n=6
Uric acid (3.1-6.3 mg/dL for 3 rd trimester) [4]	6.1 \pm 2.2 n=16	5.9 \pm 1.5 n=12	4.2 \pm 1.3 n=12	3.5 \pm 0.5 n=14	4.0 \pm 0.8 n=8	3.8 \pm 1.1 n=6
eGFR (CKD-EPI, mL/min/1.73m ²) (117-182 for 3 rd trimester) [4]	111.6 \pm 17.4 n=16	107.9 \pm 22.3 n=12	122.5 \pm 10.8 n=12	125.9 \pm 9.1 n=14	124.1 \pm 14.8 n=7	126.8 \pm 9.0 n=6
Lipid peroxidation (nmol MDA + 4HNE/g prot.)	98.9 \pm 64.5 n=16	153.3 \pm 133.3 n=12	150.7 \pm 121.7 n=11	127.9 \pm 122.5 n=13	182.6 \pm 110.2 n=5	116.9 \pm 59.7 n=5
TAA (mg Tx/g prot.)	2.08 \pm 0.9 n=16	2.6 \pm 1.3 n=12	3.7 \pm 1.2 n=11	10.2 \pm 11.1 n=11	4.9 \pm 1.3 n=5	7.2 \pm 7.1 n=5
Lipid peroxidation/ TAA ratio	73.2 \pm 99.2 n=16	65.7 \pm 51.7 n=12	39.5 \pm 25.8 n=11	22.9 \pm 40.4 n=11	39.8 \pm 28.3 n=5	28.0 \pm 20.3 n=5

E-PE, early onset preeclampsia; E-PE&IUGR, early-onset preeclampsia plus intrauterine growth retardation; E-IUGR, early-intrauterine growth retardation, L-IUGR, late-intrauterine growth retardation; L-PE, late-onset preeclampsia; GH, gestational hypertension; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula; TAA, total antioxidant activity. ^Cutoff value for exclusion of preeclampsia.

Figure S1. Evolution of Sr levels throughout pregnancy in serial samples from each E-PE patient.

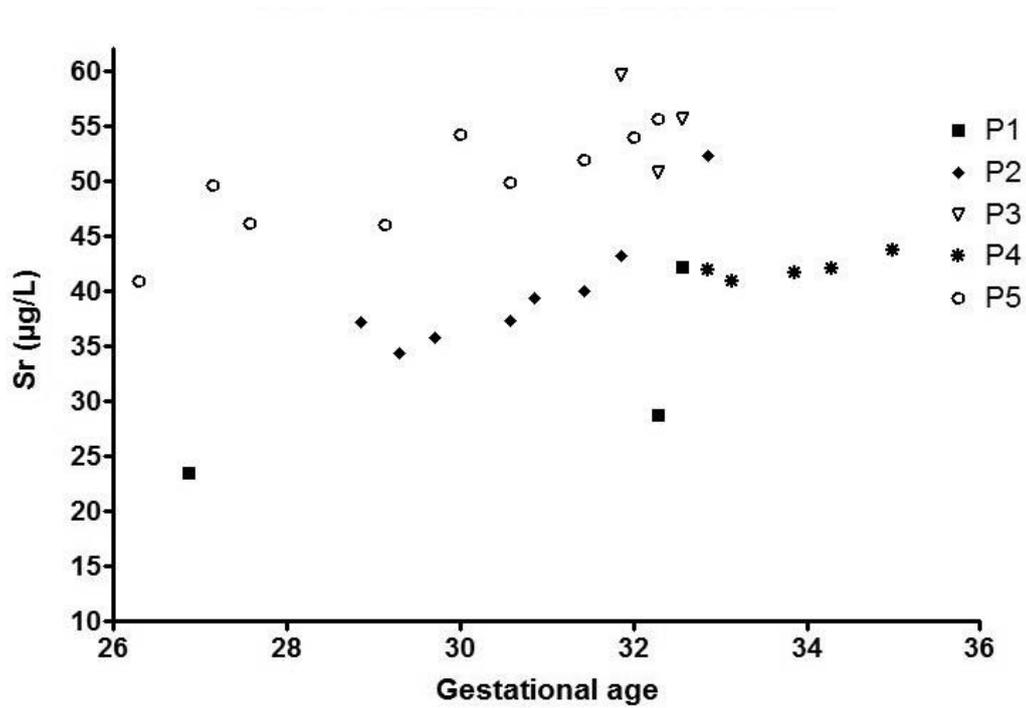


Figure S2. Evolution of TAA levels throughout pregnancy in serial samples from each E-PE patient.

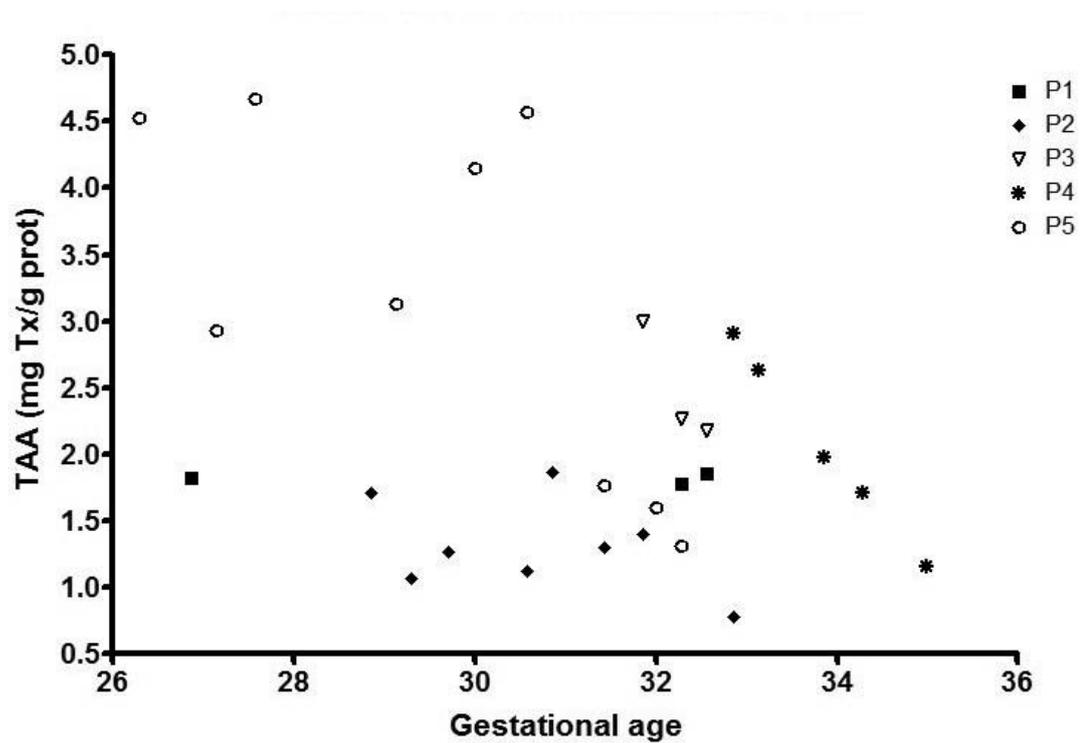


Figure S3. Relation between Sr levels and eGFR in serial samples from each a) E-PE patient and b) patient with other pathologies.

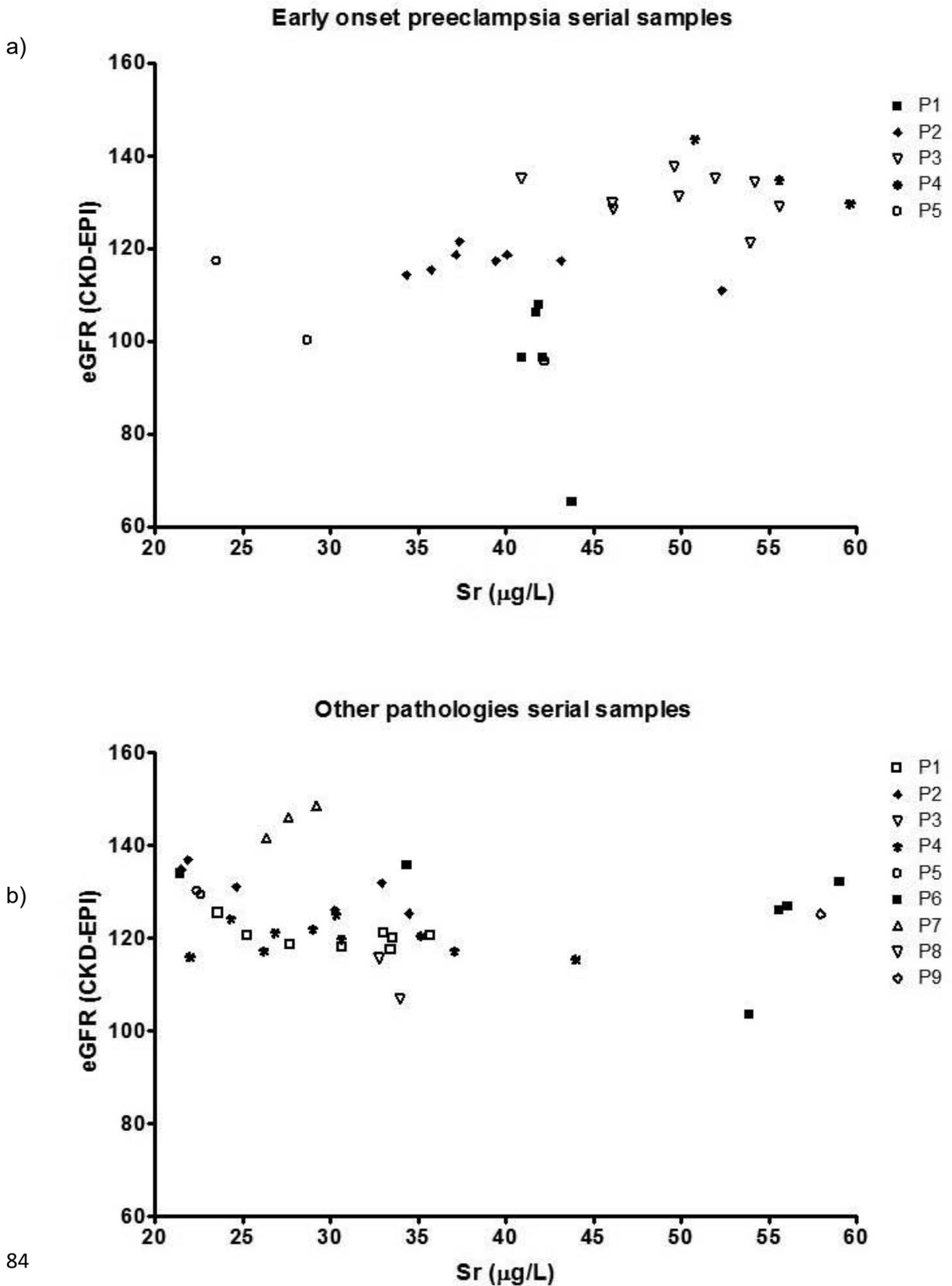


Figure S4. Relation between Sr levels and sFlt-1/PIGF ratio in serial samples from each E-PE patient.

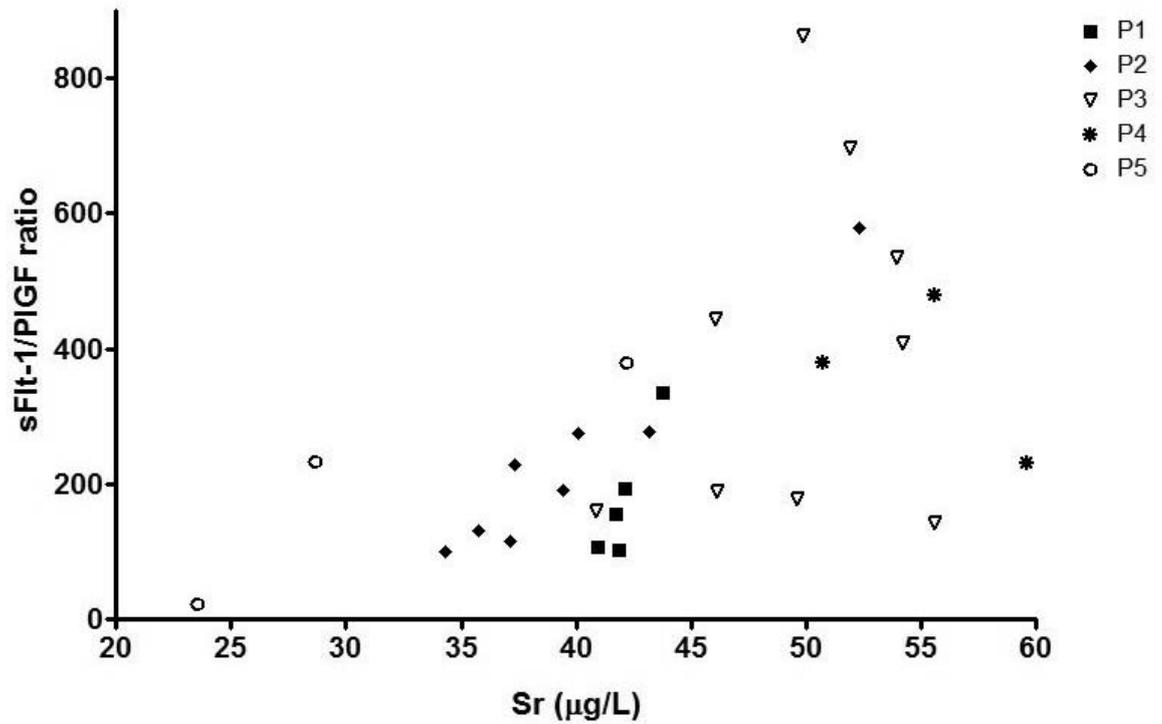
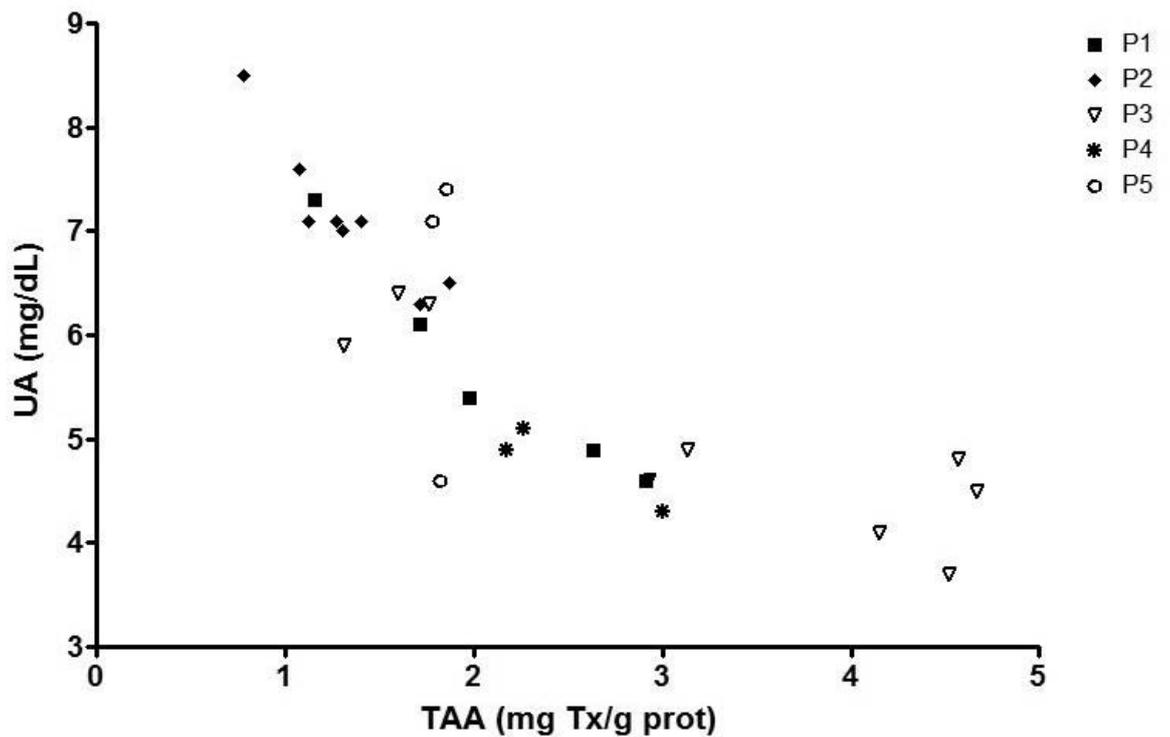


Figure S5. Relation between UA and TAA (mg Tx/g prot) levels in serial samples from each E-PE patient.



REFERENCES:

[1] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS, *Biol Trace Elem Res* 80(1) (2001) 77-93.

[2] S. Verlohren, A. Galindo, D. Schlembach, H. Zeisler, I. Herraiz, M.G. Moertl, J. Pape, J.W. Dudenhausen, B. Denk, H. Stepan, An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 202(2) (2010) 161.e1-161.e11.

[3] S. Verlohren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk, H. Stepan, New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia, *Hypertension* 63(2) (2014) 346-52.

[4] M. Abbassi-Ghanavati, L.G. Greer, F.G. Cunningham, Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians, *Obstet Gynecol* 114(6) (2009) 1326-31.

5. Discusión

5. Discusión

5.1 Estroncio y otros elementos traza en el embarazo sano

El estudio de la evolución de los niveles séricos de Sr y otros elementos traza en muestras procedentes de gestantes sanas nos permitió comparar su comportamiento y determinar si existía o no una cinética común entre todos ellos, que sugiriese una alteración inespecífica de las concentraciones de Sr. Nuestros resultados de Cu y Se a lo largo del embarazo sano se corresponden mayoritariamente con los reportados por otros autores (144-149). Mientras que el Se se mantiene estable en los dos primeros trimestres de gestación, su concentración disminuye de forma significativa en el 3^{er} trimestre (figura 11).

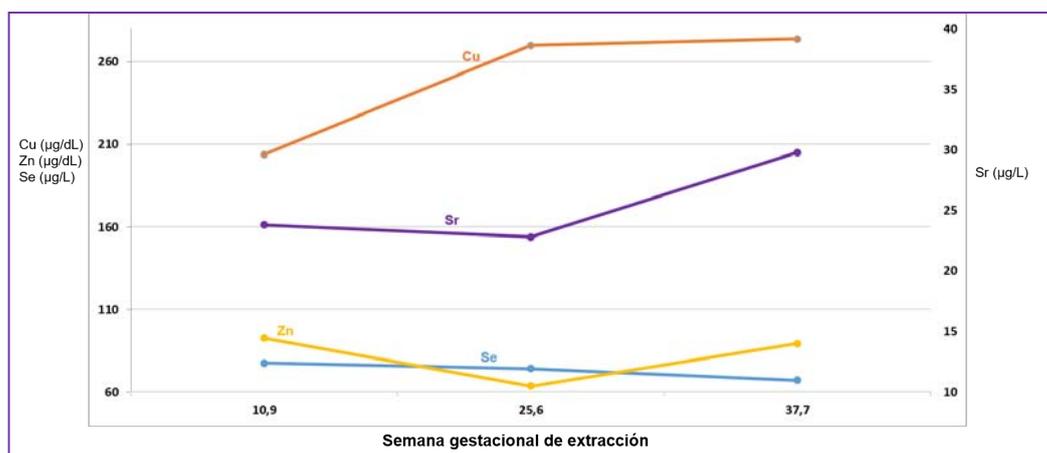


Figura 11. Evolución Cu, Se, Zn y Sr durante el embarazo sano. Datos procedentes de gestantes sanas seriadas durante los tres trimestres de embarazo (tabla 3, artículo 1), y representados gráficamente para facilitar la discusión de este apartado.

Por su parte, las concentraciones medias de Cu aumentan considerablemente ya en el 2^o trimestre, para mantenerse estables en el tercero. Por el contrario, los resultados obtenidos para el Zn son diferentes a los publicados en otros estudios (144-146, 150-152), que muestran una tendencia descendente de este elemento a lo largo del embarazo. En nuestro estudio se observó un descenso en los niveles de Zn en el 2^o trimestre de gestación para luego volver a elevarse en el 3^{er} trimestre y alcanzar niveles

similares a los del primero. Desconocemos la causa de esta diferencia, por lo que estudios con mayor número de muestras serían necesarios para corroborar nuestros resultados.

Podemos constatar, tras medir los niveles de Sr sérico en distintos momentos del embarazo, que su evolución es claramente ascendente entre el 2º y 3º trimestres de embarazo, manteniéndose estable en los dos primeros trimestres de gestación. Esta evolución es distinta a la del resto de elementos traza estudiados. Aunque los niveles séricos de Cu también son ascendentes, éstos se elevan de forma más temprana, a diferencia de los niveles séricos de Sr, que no se elevan hasta el 3º trimestre. Estos datos concuerdan con los de otro estudio en el que se midieron los niveles de Sr en embarazadas sanas chinas durante los tres trimestres de la gestación, encontrándose efectivamente una elevación de la concentración de Sr sólo en el 3º trimestre, mientras que en el 1º y 2º trimestres los niveles fueron similares y significativamente inferiores a los del tercero (144). Las razones por las que se produce esta elevación en las concentraciones de Sr son, a priori, desconocidas, aunque en el trabajo citado se sugiere que los cambios metabólicos típicos del embarazo podrían causar que cierta cantidad de elementos traza sea liberada al torrente sanguíneo.

5.2 Estroncio en la preeclampsia, hipertensión gestacional y crecimiento intraútero retardado

El estudio del estatus de los niveles séricos de Sr en gestantes con PE y su comparación con gestantes sanas, HTAG y CIR se muestra en los artículos 2 y 3.

En el segundo trabajo, los niveles de Sr evaluados en gestantes con PE o con HTAG fueron analizados en dos momentos: en la última muestra de suero disponible previa al momento del parto, lo que implica que, en la mayoría de ocasiones, los síntomas clínicos de la enfermedad estaban presentes desde hacía días o incluso semanas, y en las muestras disponibles del 1º trimestre, con el objetivo de investigar el posible valor predictivo del Sr al comienzo de la

gestación. Respecto a los resultados, se obtuvieron niveles de Sr superiores en gestantes con PEP y PET frente a los encontrados en gestantes sanas y con HTAG, en la última muestra disponible previa al momento del parto. Sin embargo, las concentraciones séricas de Sr medidas en el 1^{er} trimestre en gestantes sanas, o que luego desarrollarían HTAG, resultaron no ser diferentes a las halladas en gestantes que luego desarrollarían PE, descartando de esta forma una elevación precoz de este elemento. El estudio de Rezende et al (139) también mostró concentraciones plasmáticas de Sr más altas en pacientes con PE al compararlas con gestantes sanas, entre las semanas gestacionales 27-39. Por tanto, nuestros resultados y los de este autor coinciden en una elevación significativa en mujeres que desarrollan la enfermedad, frente a las que no la padecen, aunque nosotros encontramos esta diferencia significativa también cuando incluimos gestantes con HTAG. Dicho autor especula que, durante la PE, puede tener lugar una mayor remodelación ósea y aumentar así los niveles de Sr en lugar de los de Ca, sugiriendo que el Sr podría tener una participación en la fisiopatología de la PE. Nuestros resultados acerca de las concentraciones séricas del 1^{er} trimestre indican que esta elevación, además, no se produce hasta que la enfermedad está más avanzada o, al menos, instaurada. Con la hipótesis de una posible elevación de los niveles séricos de Sr en el momento de aparición de los síntomas de la PE, o incluso unas semanas antes, en el 2^o trimestre de gestación, se llevó a cabo el tercer trabajo.

Así, en la última publicación que forma parte de esta tesis, se evaluaron las concentraciones séricas de Sr en el momento en que la gestante desarrollaba los primeros síntomas clínicos sugerentes de PE, comparándose gestantes diagnosticadas de PE frente a gestantes diagnosticadas de CIR o HTAG y agrupándose la población de estudio en función de la semana gestacional de extracción: antes (“grupo precoz”) o después de la semana 34 (“grupo tardío”). También se evaluaron en las muestras disponibles unas semanas antes, correspondientes al programa de cribado de la diabetes gestacional del 2^o trimestre (semana gestacional 25 aproximadamente). En este periodo, tal y como vimos en el artículo 1, las concentraciones de Sr en gestaciones sanas permanecían aún invariables respecto al 1^{er} trimestre, por lo

que, en el caso de existir una elevación en este periodo en gestantes que posteriormente desarrollarían PE, podría suponer el mejor momento para identificarlas, dado que más adelante, en el 3^{er} trimestre de gestación, las gestantes sanas ya experimentaban elevación de sus concentraciones séricas de Sr, pudiendo existir un solapamiento entre ambos grupos. El cribado de la diabetes gestacional en este momento supuso así una oportunidad de captación de pacientes, puesto que, además, no implicaba para la gestante ninguna extracción de muestra adicional. Sin embargo, esta captación fue limitada debido a que no todas las gestantes que desarrollaron PE/CIR/HTAG posteriormente, realizaron este cribado en el HUCA, por lo que no pudieron recuperarse todas las muestras correspondientes a este periodo en la población de estudio. Los resultados a este respecto no fueron los esperados: antes del inicio de los síntomas las concentraciones de Sr en gestantes que más tarde desarrollarían PE no difirieron de aquellas que desarrollarían CIR o HTAG (figura 12).

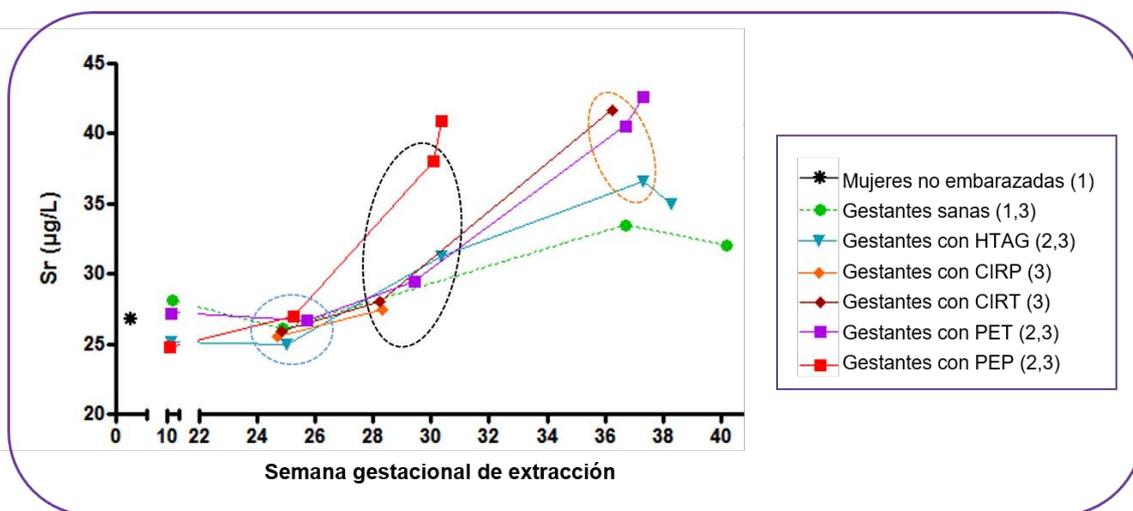


Figura 12. Niveles de Sr en mujeres no embarazadas y a lo largo del embarazo en gestantes sanas y gestantes con distintas patologías. Marcados con óvalos semi-punteados, las concentraciones séricas de Sr medidas en distintos momentos, artículo 3. Óvalo azul, concentraciones encontradas en el 2º trimestre, durante el control para la diabetes gestacional; óvalo negro, concentraciones halladas al inicio de los síntomas en el grupo precoz (semana gestacional de extracción <34), el mejor momento en el que el Sr diferenciaría una gestación con PEP de una gestación con otra patología o sana; óvalo naranja, concentraciones halladas al inicio de los síntomas en el grupo tardío (semana gestacional de extracción ≥34). El último punto verde en gestantes sanas corresponde a las concentraciones encontradas en el grupo posparto del primer trabajo (muestras extraídas aprox. 1 día tras el parto). Los

números entre paréntesis (1)(2)(3) indican los artículos 1, 2 ó 3 de donde se han extraído los datos. Esta figura corresponde a la figura 2 del artículo 3, y se incluye en este apartado para facilitar la discusión.

Sin embargo, sí existió diferencia en las concentraciones de Sr cuando se evaluaron al inicio de los síntomas, donde se observaron niveles incrementados en gestantes con PE al compararlos con los encontrados en HTAG y CIR, aunque de forma significativa sólo en el caso de gestantes con PEP (grupo precoz). Esto es debido a que las gestantes con otras patologías, antes de la semana 34, aún no manifiestan niveles pronunciadamente elevados de Sr, mientras que, después de la semana 34, sí, tal y como puede observarse en la figura 12. De hecho, es llamativa la elevación de los niveles de Sr en el CIRT cuando el inicio de los síntomas es después de la semana 34, ligeramente superiores incluso a los hallados en la PET.

Estos resultados sugieren que los niveles séricos de Sr se alteran solo cuando aparecen los primeros síntomas de la PEP y no antes, al comienzo del desarrollo de la fisiopatología de la enfermedad. Ello, junto a la cinética observada en las gestaciones seriadas, tanto de embarazadas sanas como con patología, muestra una tendencia ascendente en los niveles de Sr de forma general, pero el momento y la intensidad del incremento es distinto según sea un embarazo sano, un embarazo con PE o un embarazo con otras patologías. Por lo tanto, la semana gestacional de medición de los niveles de Sr determina la magnitud de la diferencia encontrada entre PE y otras patologías. El CIRP, tal y como puede verse en la tabla S1 del tercer trabajo, y en la figura 12, mostró al inicio de los síntomas niveles de Sr muy inferiores a los encontrados en la PEP. A pesar de que la semana gestacional de medición era muy similar entre una y otra patología, no fue exactamente la misma, pudiendo esto influir en los datos, pero la diferencia entre la semana gestacional de extracción en la PEP y el resto de patologías resultó ser no significativa (tabla 2, artículo 3). Podría establecerse un orden en cuanto a intensidad de la elevación de los niveles de Sr en las distintas patologías, al inicio de los síntomas y en el grupo precoz, de la forma: PEP> HTAG> PET> CIRT>CIRP.

Las concentraciones séricas de Sr no son significativamente diferentes al inicio del embarazo cuando se compara PE versus gestantes sanas/HTAG (artículo 2), ni en el 2º trimestre, antes del inicio de los síntomas, cuando se compara PE versus CIR/HTAG (artículo 3). Además, tampoco son distintas cuando se compara el grupo PET con CIR/HTAG, al inicio de los síntomas, tras la semana gestacional 34, ya que se analizan aproximadamente unas 7 semanas más tarde que en el grupo precoz, y esta demora en el tiempo hace que las concentraciones de Sr en gestantes con otras patologías se lleguen a elevar lo suficiente como para hacer que no existan diferencias con la PET. Lo mencionado anteriormente explicaría, por tanto, el distinto rendimiento diagnóstico del Sr según el momento evaluado: el Sr es mejor marcador de PEP que de PET cuando, además, es medido al comienzo de los síntomas y comparado con otras patologías (tabla 8).

Grupos comparados	Al final de la gestación (artículo 2)			Al inicio de los síntomas (artículo 3)
	PEP vs. C2T+C3T	PEP vs. C2T+GH	PET vs. C3T+GH	PEP vs. CIR/HTAG/PET
Semana gestacional de extracción	31.1 [28.9–32.6] vs. 36.1 [25.1-36.7], $p>0.05$	31.1 [28.9–32.6] vs. 30.9 [25.0–37.4], $p>0.05$	37.3 [35.9–38.8] vs. 36.8 [36.3–38.4], $p>0.05$	30.1 ± 2.6 vs. 28.8 ± 2.7, $p>0.05$
AUC	0.74	0.70	0.71	0.76
p-valor	<0.0001	0.0002	0.0001	<0.0001
95% I.C.	0.66 – 0.81	0.61 – 0.77	0.63 – 0.77	0.65 – 0.86
Error estándar	0.05	0.05	0.04	0.06
Punto de corte (µg/L)	>31.3	>33.4	>36.1	>29.4
Sensibilidad (%)	74.4	69.2	71.6	78.6
Especificidad (%)	65.4	61.7	63.3	70.7

Tabla 8. Datos de rendimiento diagnóstico al utilizar las concentraciones de Sr como biomarcador de PE, al final de la gestación o al inicio de los síntomas (artículos 2 y 3, respectivamente). Nótese los distintos puntos de corte establecidos y los grupos comparados, observándose mejor sensibilidad y especificidad al comparar PEP vs otras patologías al inicio de los síntomas. AUC, área bajo la curva; I.C., intervalo de confianza. Las AUC encontradas en cada caso no difieren significativamente entre sí.

Cuanto antes se determine, mayor será la diferencia de niveles entre los grupos, pudiendo identificar con mejor rendimiento diagnóstico a las gestantes con PEP. Por ello, los datos de rendimiento diagnóstico observados al inicio de los síntomas son mejores, aunque no significativamente, que los observados al final de la gestación, tanto en sensibilidad, especificidad, como área bajo la curva (AUC).

Todo esto podría explicar, así mismo, la correlación negativa encontrada en las gestantes del grupo precoz entre los niveles de Sr y los días transcurridos entre la extracción de la muestra de suero y la necesidad de inducir el parto como consecuencia de la enfermedad, mostrando un discreto valor de discriminación de necesidad de finalización del embarazo, independientemente de la patología. Sería necesario realizar nuevos estudios para determinar cuál es el valor pronóstico del Sr respecto al desenlace del embarazo en gestaciones que aún no han superado la semana gestacional 34, como se está haciendo actualmente con otros marcadores complementarios a la relación sFlt-1/PIGF (4). Por otro lado, se trató de determinar si las concentraciones de Sr podían estar relacionadas con la existencia o no de severidad en la PE, pero las concentraciones séricas de Sr no difirieron entre gestantes con y sin características severas, ni en el grupo precoz ni en el tardío, no pudiendo considerar a este elemento como marcador de severidad.

Para tratar de dilucidar las posibles causas de la elevación del Sr en la PE, en los tres artículos que forman parte de esta tesis se evaluaron y compararon los resultados de varios parámetros bioquímicos que han sido relacionados con la fisiopatología de la PE, como el Ca, el ácido úrico, el estrés oxidativo, la función cardiointertricular (NT-proBNP), el estado angiogénico (sFlt-1, PIGF) y la función renal (TFGe).

5.3 Estroncio, calcio y metabolismo óseo

Los niveles séricos del Ca fueron evaluados en gestantes sanas (artículo 1) y gestantes con PE y con HTAG (artículo 2).

En el primer trabajo encontramos una evolución descendente de los niveles de este elemento según avanzaba la gestación, y en el segundo trabajo, la concentración de Ca en las pacientes con PEP resultaron estar disminuidos, aunque dentro de la normalidad, respecto a las gestantes sanas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en varios estudios que han demostrado que las gestantes con PE presentan niveles disminuidos de Ca plasmático y urinario (153-155). Se ha sugerido que la adaptación necesaria en los mecanismos homeostáticos del Ca durante el embarazo es deficiente en la PE, contribuyendo así a la disfunción del músculo liso vascular, la disfunción endotelial y la severa constricción encontradas en esta patología (156).

Debido a la analogía química y física existente entre el Ca y el Sr, estos dos elementos se intercambian fácilmente en diversos tejidos biológicos, incluida la red de hidroxapatita del hueso (157, 158). Existe evidencia de que, en sujetos con función renal normal, una dieta alta en Sr va acompañada de una mayor presencia de este elemento en el mineral óseo (159). El Sr no está firmemente unido a la red cristalina del hueso, por lo que es reemplazado fácilmente por Ca una vez que deja de ser suplementado (159). Este hecho podría implicar algún tipo de relación entre ambos elementos. Así, una correlación positiva entre Ca y Sr podría deberse a una sensibilización o retroalimentación positiva de sus transportadores y/o receptores, mientras que una relación negativa, podría deberse a la sustitución de un elemento por el otro. Para averiguar si la evolución observada en las concentraciones de Sr era consecuencia de cambios en las concentraciones de Ca, estudiamos la posible relación entre ambos elementos, sin encontrar correlación alguna en gestantes sanas (artículo 1), ni en gestantes con PE (artículo 2), aunque una correlación débil y negativa se encontró al evaluar conjuntamente a las gestantes con PE y HTAG del segundo trabajo. Las concentraciones de Ca sérico en el cuerpo humano son mucho mayores que las concentraciones de Sr (relación de aproximadamente 30000:1), por lo que una pequeña disminución porcentual en los niveles séricos de Ca supondría, en el caso de existir sustitución de un elemento por el otro, un gran aumento porcentual en las concentraciones séricas de Sr. Sin embargo, los resultados no concluyentes no permitieron

clarificar la existencia o no de una asociación entre ambos elementos, siendo necesarios más estudios para poder confirmar dicha relación.

Respecto al metabolismo óseo durante el embarazo, existe un aumento del remodelado óseo para satisfacer la demanda de Ca por parte del feto, existiendo una gran transferencia neta de minerales de la madre al feto a través de la placenta, lo cual requiere una notable adaptación fisiológica (160). Lo que se observa en el embarazo sano es un aumento de los marcadores de resorción ósea en el 1^{er} trimestre, seguido de marcadores elevados de formación de hueso en el tramo final de la gestación (161, 162). Se ha demostrado un metabolismo óseo materno alterado en embarazos complicados por PE (sin diferenciar PEP de PET) y HTAG, en comparación con embarazos normales, que conduce a una reducción adicional de la densidad mineral ósea (163, 164). La resorción ósea aumenta significativamente durante el embarazo en las mujeres que desarrollan PE, en comparación con las que siguen siendo normotensas, mientras que la formación de hueso es equiparable en ambos grupos (165). Esta resorción ósea aumentada podría, por tanto, suponer una mayor liberación de Sr desde el tejido óseo al torrente sanguíneo, algo que ya ha sido sugerido previamente por otros autores (139, 166). En el caso de los niveles sanguíneos del Ca, éstos no aumentarían debido a los mecanismos homeostáticos encargados de mantener las concentraciones sanguíneas de este elemento estrictamente constantes (167), mientras que los niveles sanguíneos de Sr no estarían bien regulados y, por lo tanto, podrían aumentar en circunstancias de aumento del recambio óseo (168, 169).

Respecto al CIR, varios estudios han evidenciado una ausencia de remodelado óseo alterado en mujeres con fetos afectados por esta patología (170, 171).

En situaciones ajenas al embarazo donde también existe un metabolismo óseo alterado, como en la enfermedad renal diabética (166), se ha descrito una asociación de la concentración plasmática de Sr con parámetros del metabolismo óseo alterado, o en la osteoporosis desarrollada en algunos tipos de cáncer (172, 173), donde se encontraron niveles sanguíneos incrementados de Sr en pacientes con cáncer de pulmón, estando

este elemento relacionado con el estadio de la enfermedad y el desarrollo de osteoporosis. Sugieren un metabolismo óseo alterado como la razón de la elevación del Sr en estos pacientes.

5.4 Estroncio, ácido úrico y estrés oxidativo

El ácido úrico y el estrés oxidativo se evaluaron en los tres trabajos que componen esta tesis. Los niveles aumentados de estos parámetros encontrados en gestantes con PE son acordes a los descritos en la literatura. Así, la hiperuricemia es un hallazgo característico en la PE (50), y se han encontrado niveles de ácido úrico elevados en mujeres con PE comparado con gestantes con HTAG (174, 175). El ácido úrico actúa como un antioxidante fisiológico, ya que es un depurador de diferentes radicales libres y quelante de iones metálicos en transición (176). La lesión isquémica y el estrés oxidativo promueven un círculo vicioso en la producción de ácido úrico, ya que su función antioxidante da como resultado la formación del radical urato (177), el cual persiste y puede potencialmente modificar oxidativamente las proteínas placentarias y los lípidos (178). Ya mencionamos, por otro lado, la existencia de un estado oxidativo alterado en la PE (6, 91, 112), desempeñando también un papel importante en el CIR (179, 180), pero de manera más leve (73).

Los resultados del primer y segundo trabajos son muy sugerentes de la existencia de una relación entre Sr, ácido úrico y estrés oxidativo. En ambos trabajos se observa que el Sr y el ácido úrico se relacionan de forma inversa con la defensa antioxidante, y de forma directa con la relación peroxidación lipídica/defensa antioxidante. Al estudiar esta relación en el tercer trabajo, aunque sí encontramos de nuevo la misma asociación entre los niveles de ácido úrico y estrés oxidativo en las muestras de gestantes con PEP (figura S5, artículo 3), ésta no fue significativa entre el Sr y el ácido úrico, ni entre el Sr y el estrés oxidativo. Las razones para ello pueden ser los distintos grupos de pacientes evaluadas, el tamaño muestral, así como el periodo gestacional evaluado. Mientras que, en el primer trabajo, las muestras correspondían a 20 gestantes sanas en los tres trimestres, en el segundo trabajo correspondieron a gestantes con PE seriadas desde el 1^{er} trimestre hasta el parto en el caso del

ácido úrico, y en muestras independientes de distintos grupos, en el caso del estrés oxidativo. En el último trabajo, las asociaciones en ambos casos se evaluaron en 5 gestantes con PEP y 9 con otras patologías, desde el inicio de los síntomas hasta el parto. Estas diferencias suponen una limitación importante, y por la cual no hemos podido determinar de forma concluyente una relación entre Sr, ácido úrico y estrés oxidativo en el desarrollo de esta tesis.

A pesar de lo mencionado, las correlaciones altamente significativas encontradas en los primeros trabajos entre los tres parámetros (figura 2, artículo 1; figura S2, artículo 2), podrían sugerir, de forma muy prudente, que el Sr podría estar implicado en el estatus oxidativo. A este respecto, varios estudios experimentales en los que se ha utilizado el Sr elemental o el Sr en forma de ranelato de Sr sugieren una mejora del estatus oxidativo en presencia de este elemento. Así, en uno de estos estudios (181) se investigó el efecto del ranelato de Sr en el estrés oxidativo y en la defensa antioxidante en ratas hembra ovariectomizadas. Los niveles de MDA, SOD, GPx y CAT se determinaron en hígado y riñón, encontrándose concentraciones de MDA disminuidas y actividades de GPx y CAT elevadas en el grupo tratado con ranelato de Sr, en ambos órganos, comparados con el grupo sin tratar (figura 13). En este estudio se sugiere que el tratamiento con Sr podría tener un efecto depurador sobre la peroxidación lipídica causada por la ovariectomía, estimulando la actividad de CAT y GPx, concluyendo que el Sr tiene un efecto preventivo de daño celular en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica.

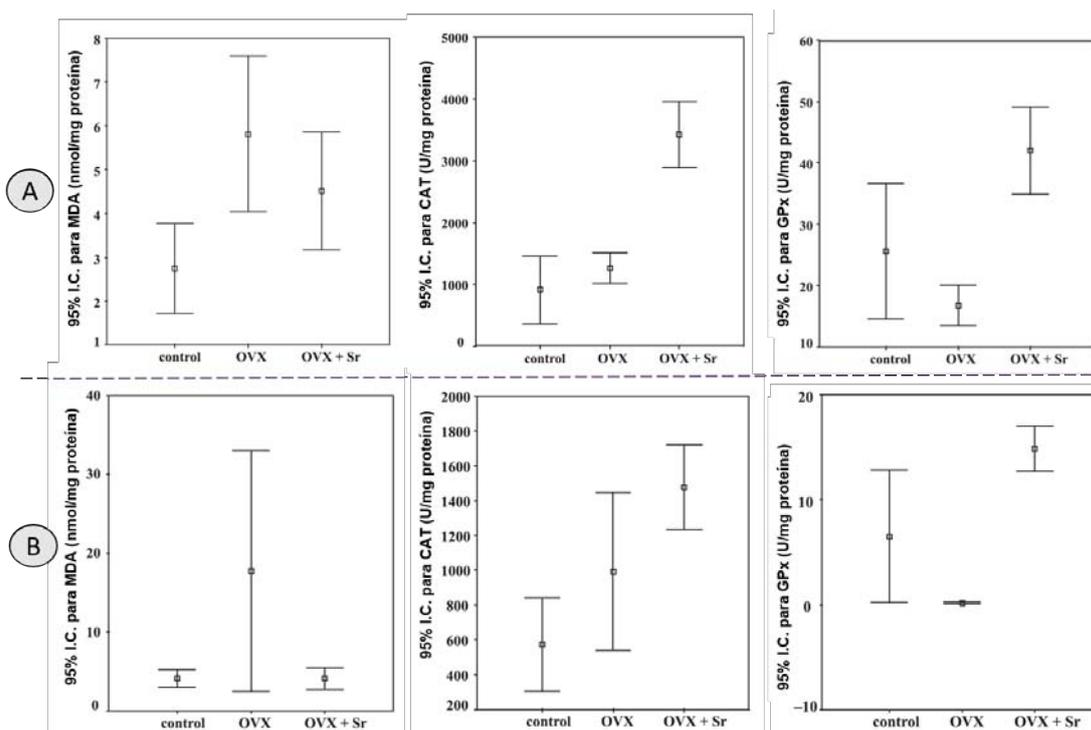


Figura 13. Resultados más relevantes de las concentraciones de MDA, CAT y GPx en hígado (A) y riñón (B) de ratas tras ser ovariectomizadas. Control, ratas operadas de forma simulada, con solución salina administrada; OVX, ratas ovariectomizadas; OVX+Sr, ratas ovariectomizadas con tratamiento de ranelato de Sr desde la operación hasta el sacrificio, 4 meses después. MDA, malondialdehído; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa. Concentraciones representadas como medianas e intervalos de confianza del 95%. Modificado de Yalin et al (181).

Lu S y col. (182), estudiaron la relación de varios elementos traza con el estrés oxidativo en el ADN por medio de la medición de 8-OHdG en 53 estudiantes de China, observándose una correlación altamente significativa entre el Sr y el 8-OHdG ($r=0.43$, $p=0.001$). El estudio de Jiang y col. (183) demostró que el Sr prevenía la lipogénesis hepática por medio del alivio del estrés del retículo endoplásmico, sugiriendo que este elemento podría ser utilizado como terapia para la prevención y el tratamiento del hígado graso no alcohólico. Por último, Bail Y y col. (184) sugieren un papel protector del Sr frente al daño cromosómico causado por la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, al mejorar la capacidad de reparación del ADN celular. En el proceso de carcinogénesis química, es posible que los hidrocarburos aromáticos policíclicos produzcan ERO que aumentan la carga del estrés

oxidativo (185), por lo que niveles elevados de Sr podrían contrarrestar las acciones de estas ERO y reducir así el estrés oxidativo.

Nuestros resultados, junto con lo previamente mencionado, sugieren que los niveles de Sr podrían elevarse ante la existencia de un estado oxidativo alterado, por lo que este elemento estaría ejerciendo una acción similar a la del ácido úrico en el contexto de “aliviar” el estrés oxidativo que aparece en la PE, aunque finalmente el balance entre daño y defensa sea desfavorable en la PE.

5.5 Estroncio, NT-proBNP y función cardiovascular

Los niveles de NT-proBNP se evaluaron en gestantes sanas, con PE y HTAG en el segundo trabajo, en la muestra disponible más cercana al parto (tabla 2, artículo 2), así como en las muestras disponibles correspondientes al 1^{er} trimestre (tabla S2, artículo 2). Mientras que no se encontraron diferencias al comienzo de la gestación entre aquellas gestantes que luego desarrollarían PE frente a las que no, estando los valores de NT-proBNP dentro del intervalo de referencia (186), los niveles en las gestantes con PE, tanto PEP como PET, resultaron ser superiores frente a los encontrados en gestantes sanas y con HTAG en la muestra más cercana al parto. Esto concuerda con otros trabajos, donde se han encontrado niveles superiores de este péptido en gestantes con PE frente a gestantes normotensas (53), así como frente a gestantes con hipertensión crónica (54).

El NT-proBNP es uno de los fragmentos secretados principalmente por el ventrículo cardiaco, debido al estrés hemodinámico en respuesta al estiramiento del miocardio inducido por la carga de volumen y activado tras una sobrecarga ventricular (187). La función fisiológica del péptido natriurético es aliviar esta carga de trabajo, aumentando la natriuresis, la diuresis, la permeabilidad capilar y relajando la vasculatura periférica (188). Su concentración en suero correlaciona con el pronóstico de la insuficiencia ventricular, siendo utilizado en la práctica clínica para evaluar las disfunciones ventriculares y para el diagnóstico de la insuficiencia cardiaca. La PE se considera una enfermedad vascular específica, en la que la disfunción

endotelial puede ser el factor crucial en su patogénesis (189). Las alteraciones vasculares (disminución del gasto cardíaco, incremento de la presión arterial, reducción del volumen plasmático, aumento de la resistencia vascular y vasoconstricción generalizada) que acontecen en la PE suponen un estrés a nivel cardíaco (52). Existen varios estudios (53, 54) que correlacionan el NT-proBNP con el desarrollo, precocidad y gravedad de la PE, siendo reflejo de la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo que tiene lugar en la PE. Además, se ha evidenciado que su determinación mejora la predicción a corto plazo de necesidad de finalización del embarazo debido a PE, en comparación con la relación sFlt-1/PIGF sola, cuando esta es >38 (4).

El PRAC revisó los datos de acontecimientos tromboembólicos y cardíacos procedentes de los ensayos clínicos en pacientes con osteoporosis (3.803 pacientes tratados con ranelato de Sr y 3.769 con placebo, correspondientes a 11.270 y 11.250 pacientes/año respectivamente) (127), concluyendo que, en comparación con placebo, existía un incremento de 4 casos de acontecimientos cardíacos graves por cada 1000 pacientes tratados durante un año, y de estos casos adicionales, el 50% serían de infarto de miocardio. Se encontró un incremento similar para el tromboembolismo, con 4 casos adicionales por cada 1.000 pacientes/año en pacientes tratados con ranelato de Sr en comparación con los pacientes que recibieron placebo. Por ello, en 2014 recomendó la suspensión de su comercialización. Este hecho nos hizo pensar en un plausible nexo entre el Sr y la enfermedad cardiovascular observada en las gestantes con PE, pero debido a la débil correlación entre los niveles de NT-proBNP y Sr observada en la población de estudio en general, y nula en las gestantes con PE, no pudimos establecer relación alguna entre ambos parámetros. Hasta la fecha, no existen investigaciones que hayan estudiado los posibles mecanismos implicados en la incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes tratados con Sr. En un estudio publicado en el 2004 (122) se valoraron las concentraciones de Sr sérico en 1385 mujeres postmenopáusicas con osteoporosis antes de iniciar el tratamiento con el ranelato de Sr (2g/día) y 3 meses después, encontrando unas concentraciones medias de 26.31 y 10342 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Aunque los valores pre-tratamiento concuerdan con los valores encontrados en nuestras pacientes no

embarazadas y al inicio de la gestación, los valores post-tratamiento son muy superiores a los valores alcanzados en las mujeres con PE, por lo que es improbable que los niveles de Sr observados en mujeres con PE tengan alguna relación con la función cardiovascular alterada observada en estas gestantes.

Aunque sí existen evidencias de que el CIR supone un factor de riesgo para desarrollar en la vida posnatal múltiples desórdenes, entre ellos enfermedades vasculares (190), apenas existen estudios que evalúen la función cardioventricular en las gestantes que desarrollan CIR. Iacovidou N y col. (191) encontraron niveles plasmáticos de NT-proBNP en gestantes que desarrollaron CIR similares a los hallados en gestantes sanas, y las revisiones realizadas por Sharma D y col sobre esta patología (10, 70) no mencionan la existencia de una función cardioventricular alterada en las gestantes que desarrollan dicha enfermedad.

5.6 Estroncio, relación sFlt-1/PlGF y estado angiogénico

Los factores angiogénicos fueron evaluados en el segundo y tercer trabajo, donde los resultados significativamente más elevados del cociente sFlt-1/PlGF en gestantes con PE concuerdan con la literatura (192, 193). Al evaluar la relación entre este parámetro y las concentraciones séricas de Sr, encontramos resultados no concluyentes. Mientras en el segundo trabajo no se constató relación alguna, en el tercero se observó una relación directa y significativa en gestantes con PEP, no así en gestantes con otras patologías. Los análisis de correlación en ambos trabajos se aplicaron en distintos grupos de estudio y en distinto momento gestacional, pudiendo ser ésta una causa que contribuyó a las diferencias observadas. En el segundo artículo, la correlación se evaluó en gestantes con PEP, PET y HTAG, sin diferenciar entre unas y otras pacientes, y en un momento puntual, en la muestra disponible más cercana al parto. En el tercer trabajo, sin embargo, la relación se evaluó en las muestras de las gestantes seriadas desde el inicio de los síntomas hasta el parto, y en dos grupos por separado: gestantes con PEP y gestantes con otras patologías.

El hecho de que en el tercer trabajo exista una correlación positiva tan significativa entre el Sr y la relación sFlt-1/PIGF en gestantes con PEP (figura S4, artículo 3), y teniendo en cuenta que sFlt-1 es un factor anti-angiogénico, puede sugerirse un nexo entre el Sr y un estado anti-angiogénico. Así, el estudio de Rezende et al (139) encontró también una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de Sr y la sEng, proteína anti-angiogénica, en gestantes con PE, HTAG y sanas, (revisar figura 10, apartado 1.3.4 para más detalles). No encontraron, por el contrario, correlación entre esta proteína y el resto de elementos traza estudiados (Zn, magnesio, Co, Cu y Se). En la figura 7 (revisar apartado 1.1.4.1 para más detalles) podemos observar que el estado anti-angiogénico ya es patente en la semana 23 de gestación en embarazadas con disfunción placentaria. Por otro lado, la sEng también está significativamente elevada en la semana gestacional 17-20 en gestantes con PEP, al comparar sus niveles con los hallados en gestantes normotensas (194). Sin embargo, en este periodo, las concentraciones de Sr en gestantes con PEP no son distintas a las gestantes sanas o con otras patologías (figura 12, discusión), por lo que podría decirse que el estado anti-angiogénico es previo a la elevación de las concentraciones en suero del Sr, pudiendo sugerirse una pequeña dependencia de dichas concentraciones en función del ambiente angiogénico. Dado que un estado anti-angiogénico no es específico de la PE, como ya se ha comentado previamente, sino común en patologías con disfunción placentaria, como el CIR, la elevación de las concentraciones de Sr tampoco sería específica de la PE. Esto podría explicar por qué, aunque las concentraciones de Sr son significativamente más elevadas en gestantes con PEP frente a CIR/HTAG al inicio de los síntomas, al combinarlas con la relación sFlt-1/PIGF para el diagnóstico de PEP, no se obtiene una mejora significativa de la AUC (figura 3, artículo 3), por lo que la implementación del Sr para diagnosticar la PEP no ayudaría a reducir la tasa de resultados falsos positivos encontrada al utilizar la relación sFlt-1/PIGF sola.

Por otro lado, la curva ROC calculada para la relación sFlt-1/PIGF en el tercer trabajo, muestra el punto de corte específico (194.25) con el que se obtendría la mejor sensibilidad y especificidad para diagnosticar PEP versus otras patologías, siendo estos resultados distintos a los encontrados en otros

estudios, bien porque el enfoque se centró en lograr una alta sensibilidad o una alta especificidad, o bien porque se enfrentaron gestantes con PE frente a gestantes sanas (193). Por ello, los puntos de corte de la relación sFlt-1/PIGF establecidos y utilizados para diagnosticar PEP en la práctica clínica son distintos a los obtenidos en nuestra curva ROC.

Respecto al papel que podría tener el Sr en la angiogénesis, varios estudios experimentales han señalado al Sr como potenciador de la angiogénesis, incrementando la expresión de VEGF y del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (195-197), modulando fenotipos de macrófagos (198) o promoviendo en los osteoblastos la secreción de citoquinas vasculares (199, 200). Por tanto, podría sugerirse que las concentraciones elevadas del Sr tendrían un efecto de retroalimentación negativa sobre el estado anti-angiogénico existente en las enfermedades con disfunción placentaria, aunque no el suficiente como para contrarrestar sus efectos.

5.7 Estroncio, tasa de función glomerular estimada y función renal

Los valores de la TFGe significativamente disminuidos en gestantes con PEP y PET obtenidos en el tercer trabajo concuerdan con la bibliografía (201, 202). En el embarazo normal, la TFG y el flujo de plasma renal aumentan entre un 40% y un 60% durante el 1^{er} trimestre (203, 204), lo que provoca una caída en los marcadores séricos de la depuración renal, como la creatinina y ácido úrico (205). En la PE, tanto la TFG como el flujo de plasma renal disminuyen entre un 30% y un 40% en comparación con un embarazo normal en el mismo periodo de gestación (201, 202), a pesar de que la creatinina a menudo permanece en el rango normal de mujeres no embarazadas (205), tal y como ocurre en nuestra población de estudio (datos no incluidos en los resultados).

Respecto a la correlación positiva encontrada entre Sr y TFGe en gestantes con PEP (figura S3a, artículo 3), esta ha de ser interpretada con precaución. Si se observan los resultados expuestos en la figura 14, puede observarse que, aunque de manera general existe una relación directa entre ambos parámetros ($r=0.56$, $p=0.02$, círculo semi-punteado negro), al observar

cada paciente de forma individual (círculos coloreados), se intuye una relación inversa.

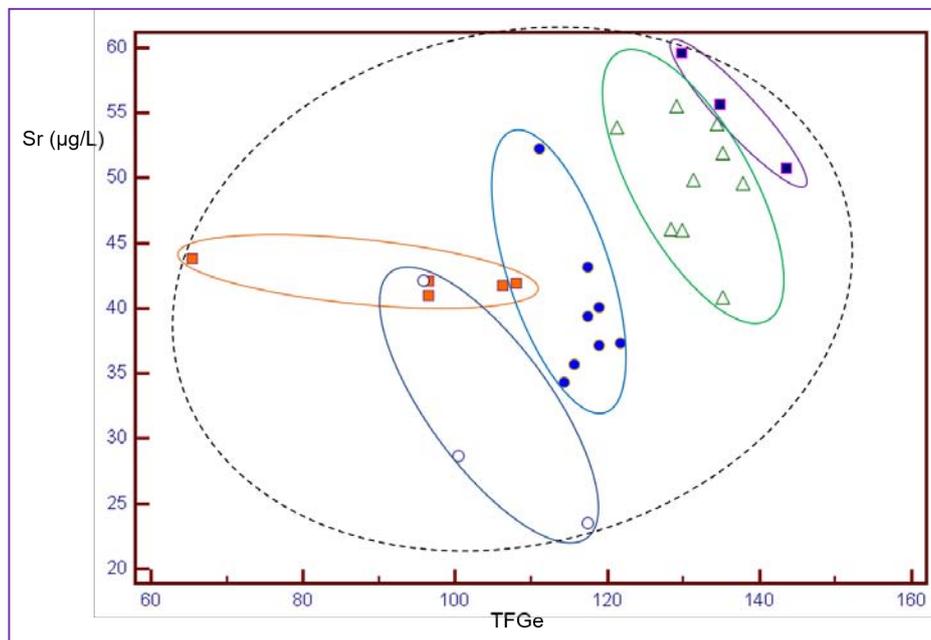


Figura 14. Correlación entre las concentraciones de Sr y la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) en gestantes con PEP. El círculo semi-punteado negro corresponde a la relación directa encontrada entre ambos parámetros al evaluar la correlación en todas las muestras. Los círculos coloreados engloban las muestras de cada paciente. Los puntos del mismo color corresponden a resultados de la misma paciente, seriada desde el inicio de los síntomas hasta el parto. Datos extraídos del artículo 3 (figura S3a), incluidos en este apartado para facilitar la discusión.

Esto podría explicarse por la existencia de una relación inversa cuando se valora de forma intraindividual, pero directa cuando se evalúa interindividualmente. A este respecto, un estudio mostró la existencia de una relación directa significativa entre valores plasmáticos de Sr y proteinuria en gestantes con PE (139) y, en un contexto ajeno al embarazo, en pacientes con enfermedad renal crónica progresiva (166), se demostró la existencia de una asociación negativa independiente entre los niveles séricos de Sr y la TFGe, así como un aumento en la concentración plasmática y una disminución en la excreción urinaria de Sr conforme avanza la enfermedad. Por último, en otro trabajo reciente (206) en el que los sujetos con una TFGe alterada (definida como $<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) fueron divididos en función de sus concentraciones plasmáticas y urinarias de distintos elementos traza, se encontró un mayor

porcentaje de participantes en el cuartil 4 de los valores plasmáticos y en el cuartil 1 de los valores urinarios de Sr, mostrando una relación inversa entre la función renal y las concentraciones de este elemento.

5.8 Futuros estudios necesarios para entender la posible relación entre los niveles séricos de estroncio y la preeclampsia

Es difícil identificar una única causa como la responsable de la elevación de las concentraciones del Sr, tanto en gestaciones sanas en el 3^{er} trimestre, como en gestaciones con PE u otras patologías. Tras analizar e interpretar los resultados obtenidos en nuestros trabajos y revisar la literatura al respecto, la elevación de las concentraciones de Sr podría responder más a un compendio de situaciones alteradas que, de forma orquestada, convergen según la enfermedad que se esté desarrollando, que a un único hecho aislado.

Observando los resultados de la tabla S1 del tercer trabajo, la PEP muestra ya al inicio de los síntomas varios parámetros alterados, que podrían ser reflejo de distintas situaciones afectadas, y en las que hemos encontrado posibles indicios de la existencia de un vínculo con las concentraciones de Sr tanto en nuestros resultados como en la literatura: una función renal disminuida, un estrés oxidativo incrementado y un desbalance a favor de un ambiente anti-angiogénico. La bibliografía sugiere, además, la existencia de un nexo entre el metabolismo óseo alterado y las concentraciones de Sr. Sin embargo, la PET, el CIRP, el CIRT y la HTAG no muestran al inicio de los síntomas ninguna de estas situaciones o, al menos, no con tanta gravedad como para detectarse mediante los parámetros evaluados.

La realización de estudios futuros sería necesaria para poder confirmar la existencia o no de un vínculo entre el Sr y las distintas situaciones alteradas, y poder establecer posibles hipótesis sobre el papel de este elemento en la patogenia de la PE (figura 15).

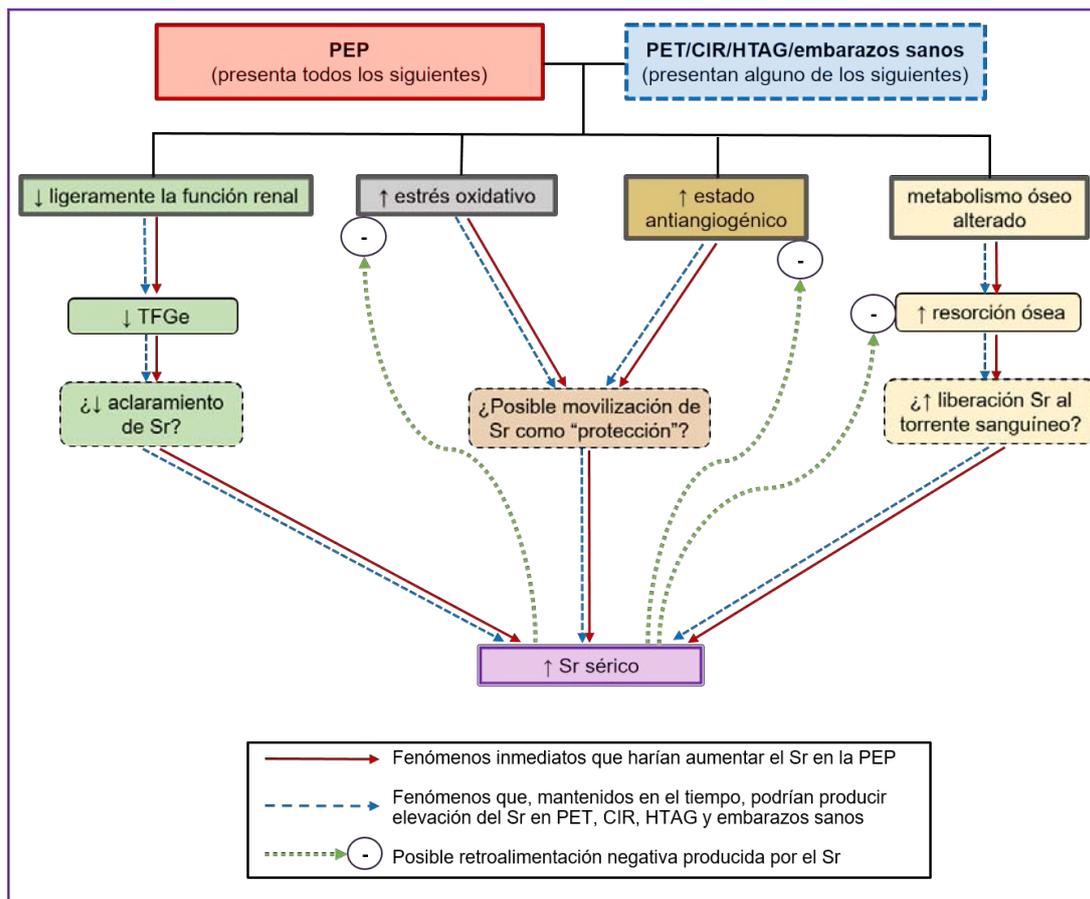


Figura 15. Futuros estudios necesarios para entender la posible relación entre los niveles séricos de estroncio y la preeclampsia. En la segunda fila se muestran situaciones que existen en la PEP de forma constatada: una función renal ligeramente disminuida, un estrés oxidativo y un estado anti-angiogénico aumentados, así como un metabolismo óseo alterado. En gestaciones sanas u otras patologías del embarazo, una o varias de estas situaciones tendrían lugar. Enmarcados en rectángulos con líneas discontinuas se muestran aspectos que deberían estudiarse en el futuro con el objetivo de establecer asociaciones entre las distintas situaciones alteradas y las concentraciones de Sr de forma más concluyente, y poder así determinar las causas directas o indirectas de su elevación. Por otro lado, el Sr reduce la resorción ósea y mantiene o incrementa la formación del hueso (122, 123), y estudios experimentales han demostrado el poder angiogénico y antioxidante del Sr, pudiendo constituir estas tres vías una retroalimentación negativa para compensar las situaciones alteradas en la PE.

Así, una función renal ligeramente disminuida pero mantenida durante semanas en la PET, podría incrementar posteriormente los niveles de Sr en esta enfermedad, mientras que en el CIR no se ha constatado afección en la función renal. El estrés oxidativo existente en gestaciones sanas, PET, CIR y

HTAG, aunque de menores dimensiones que en la PEP, al mantenerse durante el transcurso del embarazo podría elevar los niveles de Sr en semanas gestacionales más avanzadas. Por otro lado, el ambiente anti-angiogénico existente en el CIR, aunque de menores dimensiones que en la PE, si se produce de forma sostenida podría provocar la elevación del Sr observada en la forma tardía de esta enfermedad. Aunque el metabolismo óseo está afectado en la PE, los estudios no distinguen PEP de PET, por lo que no sabemos en qué grado está alterado en cada una de ellas, mientras que el CIR no parece desarrollar una afección a este respecto.

En el caso de confirmarse estas asociaciones, significaría que varias situaciones alteradas podrían ser las que determinasen directa o indirectamente las concentraciones séricas de este elemento, siendo por tanto un marcador inespecífico de la PE.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. La evolución de los niveles séricos de Sr a lo largo de un embarazo sano es ascendente y distinta a otros elementos traza estudiados (Cu, Se y Zn), aumentando significativamente en el 3^{er} trimestre de gestación.

2. Las concentraciones séricas de Sr están elevadas en gestantes con PE al compararlas con gestantes sanas/CIR/HTAG, ya desde el inicio de los síntomas propios de esta patología, pero no antes.

3. Al inicio de los síntomas, las concentraciones de Sr muestran mejor rendimiento diagnóstico para diagnosticar PEP, aunque no de forma significativa, que al final del embarazo. Cuando son añadidas a la relación sFlt-1/PIGF, el rendimiento diagnóstico no mejora significativamente.

4. Las concentraciones séricas de Sr no varían según el grado de severidad de la PE, pero sí podrían tener utilidad para ayudar a predecir la necesidad de inducir el parto en menos de 15 días como consecuencia de la enfermedad.

5. Futuros estudios son necesarios para establecer de forma más concluyente el posible vínculo entre las concentraciones de Sr y la patogenia de la PE.

7. Anexos

7. Anexos

Anexo 1: Autorización del Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias para la realización del estudio.

	SERVICIO DE SALUD DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS	HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS
		Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias C/ Celestino Villamil s/n 33006.-Oviedo Tfno: 985.10.79.27/985.10.80.28 e-mail: ceicr_asturias@hca.es
		Área Sanitaria

Oviedo, 18 de Mayo de 2016

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto de Investigación nº 74/16, titulado: " ESTUDIO DEL ESTRONCIO COMO MARCADOR DE PREECLAMPSIA". Investigador Principal Dr. Francisco V. Álvarez Menéndez Laboratorio de Medicina del HUCA.

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

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



Anexo 2. Consentimiento informado, no específico de nuestro estudio y ya existente, utilizado en parte de la población de estudio

	<p>SERVICIO DE SALUD DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS</p>	<p>GERENCIA ÁREA SANITARIA IV HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS</p>
<p>BIOQUÍMICA CLÍNICA Área Gestión Clínica Laboratorio de Medicina CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACION ALTRUISTA DE MUESTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS</p>		
<p>INFORMACIÓN: <i>Normalmente, las muestras tomadas con fines diagnósticos o de exámenes rutinarios de salud, son desechadas por el laboratorio una vez se han informado los resultados solicitados por el médico responsable. Sin embargo, el establecimiento de valores de referencia poblacionales, así como la evaluación de nuevos marcadores diagnósticos o el estudio de valores de corte específicos, para mejorar la utilidad diagnóstica de las pruebas de laboratorio, en numerosas ocasiones están supeditados a la disponibilidad de muestras de diferentes fluidos biológicos (sangre periférica, orina, líquido cefalorraquídeo, pleural, ascítico o sangre de cordón umbilical) tanto de sujetos sanos como de pacientes.</i></p>		
<p><u><i>Por tanto, la donación altruista de muestras de fluidos biológicos, orientada a la mejora de los procesos y aseguramiento de la calidad de las pruebas del laboratorio, supondría una aportación de extraordinario interés para la seguridad del paciente.</i></u></p>		
<p><i>En la mayoría de los casos, sería suficiente con conservar en condiciones adecuadas, una alícuota de las muestras tomadas como parte del propio trabajo asistencial de los laboratorios de modo que, no se requiere ninguna intervención adicional sobre el paciente.</i></p>		
<p><i>Las muestras tomadas sólo se conservarán y utilizarán para los fines expuestos en este documento de consentimiento, y en todo momento la información referente a usted será tratada de forma confidencial y codificada de manera que quede preservada su identidad (o la de la persona a la que representa).</i></p>		
<p>DECLARO QUE: <i>He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.</i></p>		
<p><i>Entiendo que la donación es altruista y que no derivará ninguna compensación.</i> <i>- He sido informado/a de que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento.</i> <i>- He sido informado por el médico Dr.</i></p>		
<p>GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS</p>	<p>C/Carretera de Rubín s/n Finca "La Cadellada" 33011 - Oviedo Teléfono: 985 108000 (Centralita)</p>	

Es importante que usted sepa y/o confirme que:

1. Se guardará confidencialidad acerca del resultado de los análisis.
2. Es posible que de este estudio no se derive ningún resultado concluyente acerca de la patología.
3. Es posible que las alícuotas conservadas, pasado un tiempo determinado, se desechen según las normas de seguridad de Laboratorio de Bioquímica Clínica.
4. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estrictamente la confidencialidad sobre su identidad.
5. Está usted de acuerdo en que las muestras biológicas codificadas puedan ser utilizadas en este estudio o para otros estudios de investigación relacionados con la enfermedad:

SI

NO

6. Tiene derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento, previa notificación por escrito.

Declaración:

Declaro que he sido informado por el médico o enfermera del procedimiento y que sé que, en cualquier momento, puedo revocar mi consentimiento.

Estoy **satisfecho** con la información recibida, he podido formular toda clase de preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para el estudio de preeclampsia.

Firma del paciente

Firma del médico/enfermera

Representante legal en caso de incapacidad del paciente, con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, tutor, etc.).

Nombre del representante legal

Firma
D.N.I.

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

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

Firma del profesional sanitario que informa

Firma del donante

Fdo.: D/Dña.....

Fdo.: D/Dña.....

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

D/Dña.....

Parentesco:.....

DNI:.....

Firma en representación del donante

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO

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

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

Firma del profesional sanitario que informa

Firma del donante

Fdo.: D/Dña.....

Fdo.: D/Dña.....

Anexo 3. Consentimiento informado, elaborado específicamente para el estudio, utilizado en parte de la población de estudio

	SERVICIO DE SALUD DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS	HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS	Área Sanitaria IV
		Avenida de Roma, s/n - 33011 - Oviedo Teléfono +34 985 108 000	
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE PREECLAMPSIA			
<p> <i>Nombre del paciente:</i> <i>Nº de historia:</i> <i>Nombre del médico/enfermera que le informa:</i> <i>Fecha:</i> <i>Servicio solicitante: Servicio de Bioquímica, Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias.</i> </p>			
<p><u>En qué consiste la preeclampsia:</u></p>			
<p> <i>La preeclampsia es uno de los trastornos hipertensivos del embarazo con mayor número de complicaciones (entre el 3 y el 10% de las gestaciones). Se define por la aparición de HTA y proteinuria a partir de la semana 20 de gestación, y dependiendo de los casos pueden aparecer síntomas como dolor epigástrico, edemas, mareos, alteraciones visuales o dolor de cabeza.</i> </p>			
<p> <i>La fisiopatología no ha sido aún completamente dilucidada, aunque se sabe que alteraciones en la placentación, el estrés oxidativo, factores inmunológicos y genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.</i> </p>			
<p> <i>En los últimos años se han propuesto varios marcadores bioquímicos, placentarios y ecográficos que tratan de ayudar a predecir la enfermedad.</i> </p>			
<p><u>En qué consiste el estudio:</u></p>			
<p> <i>El estudio consiste en la determinación de la concentración en suero de determinados parámetros bioquímicos, como algunos elementos traza, el calcio o el NT – proBNP, los cuales podrían ser utilizados como marcadores para ayudar en la prevención y diagnóstico de la preeclampsia.</i> </p>			
<p> <i>Para ello, será necesario obtener una muestra de suero:</i> </p>			
<ul style="list-style-type: none"> - <i>En aquellos casos (control rutinario del 2º trimestre de embarazo, o extracción en el Servicio de Urgencias) donde se le realice una extracción de muestra de suero como parte del control de su embarazo y para la determinación de pruebas bioquímicas, simplemente se recogerá una pequeña porción del sobrante de esa muestra para el estudio, la cual será almacenada y conservada en condiciones adecuadas.</i> - <i>En el control rutinario del 3º trimestre de embarazo (donde habitualmente no se realiza extracción de muestra de suero) será necesaria la extracción de una muestra de suero específica para el estudio, la cual también será conservada en condiciones adecuadas.</i> 			
GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS			



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fecha revoco el consentimiento prestado para el estudio de preeclampsia.

Firma del paciente

Firma del médico

Representante legal en caso de incapacidad de la paciente, con indicación del carácter con el que interviene (esposo, padre, madre, tutor, etc)

Nombre del representante legal

Firma del representante legal
D.N.I.

Anexo 4. Exención de consentimiento informado emitida por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Principado de Asturias

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE SANIDAD

Dirección General de
Planificación Sanitaria

Comité de Ética de la Investigación con medicamentos
del Principado de Asturias

Hospital Universitario Central de Asturias

N-1, S3.19

Avda. de Roma, s/n

33011 Oviedo

Tfno: 9851079 27 (ext. 37927/38028),

ceim.asturias@asturias.org

Oviedo, 28 de Enero de 2019

Se acepta la Exención del Consentimiento Informado para el estudio previamente revisado y aprobado por este CEIm (Proyecto 74/16: "ESTUDIO DEL ESTRONCIO COMO MARCADOR DE PREECLAMPSIA". Investigador Principal Dr. Francisco V. Álvarez Menéndez Laboratorio de Medicina del HUCA)



8. Bibliografía

Bibliografía

1. Mammaro A, Carrara S, Cavaliere A, Ermito S, Dinatale A, Pappalardo EM, et al. Hypertensive disorders of pregnancy. *J Prenat Med*. 2009;3(1):1-5.
2. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1122-31.
3. Visintin C, Muggleston MA, Almerie MQ, Nherera LM, James D, Walkinshaw S. Management of hypertensive disorders during pregnancy: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2010;341:c2207.
4. Sabria E, Lequerica-Fernandez P, Lafuente-Ganuza P, Eguia-Angeles E, Escudero AI, Martinez-Morillo E, et al. Addition of N-terminal pro-B natriuretic peptide to soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio > 38 improves prediction of pre-eclampsia requiring delivery within 1 week: a longitudinal cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(6):758-67.
5. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqueel H, et al. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(4):921-31.
6. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(1):40-9.
7. Tjoa ML, Oudejans CB, van Vugt JM, Blankenstein MA, van Wijk IJ. Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertens Pregnancy*. 2004;23(2):171-89.
8. Parker SE, Werler MM. Epidemiology of ischemic placental disease: a focus on preterm gestations. *Semin Perinatol*. 2014;38(3):133-8.
9. Huppertz B. An updated view on the origin and use of angiogenic biomarkers for preeclampsia. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018:1-9.
10. Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 1. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(24):3977-87.
11. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):143-8.
12. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008;51(4):970-5.
13. Savchev S, Figueras F, Sanz-Cortes M, Cruz-Lemini M, Triunfo S, Botet F, et al. Evaluation of an optimal gestational age cut-off for the definition of early- and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(2):99-105.

14. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(5):357-69.
15. Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(6):544 e1-12.
16. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308(5728):1592-4.
17. Cote AM, Brown MA, Lam E, von Dadelszen P, Firoz T, Liston RM, et al. Diagnostic accuracy of urinary spot protein:creatinine ratio for proteinuria in hypertensive pregnant women: systematic review. *BMJ.* 2008;336(7651):1003-6.
18. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(8):466-80.
19. Sibai BM. Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(3):191-8.
20. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, et al. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol.* 2000;95(1):24-8.
21. Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, Macpherson C, Hauth J, Lindheimer MD, et al. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(1):66-71.
22. Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, et al. Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(3):422-6.
23. Cortés S, Pérez F, Gobernado JA, Mora P. Epidemiología de los estados hipertensivos del embarazo. *Clin Invest Gin Obst.* 2009;36(4):132-9.
24. Auger N, Luo ZC, Nuyt AM, Kaufman JS, Naimi AI, Platt RW, et al. Secular Trends in Preeclampsia Incidence and Outcomes in a Large Canada Database: A Longitudinal Study Over 24 Years. *Can J Cardiol.* 2016;32(8):987 e15-23.
25. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003;102(1):181-92.
26. Villar J, Ba'aqeel H, Piaggio G, Lumbiganon P, Miguel Belizan J, Farnot U, et al. WHO antenatal care randomised trial for the evaluation of a new model of routine antenatal care. *Lancet.* 2001;357(9268):1551-64.

27. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp O, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(6):e323-33.
28. Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(4):391-403.
29. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*. 2006;34(6):447-58.
30. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol*. 1967;93(2):569-79.
31. Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2013;34(5):981-1023.
32. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.
33. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111(5):649-58.
34. Hagmann H, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA, Stepan H. The Promise of Angiogenic Markers for the Early Diagnosis and Prediction of Preeclampsia. *Clinical Chemistry*. 2012;58(5):837-45.
35. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update*. 2012;18(4):436-57.
36. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642-9.
37. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(3):193-201.
38. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*. 1972;1:177-91.
39. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular

response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(10):1049-59.

40. Dommissie J, Tiltman AJ. Placental bed biopsies in placental abruption. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992;99(8):651-4.

41. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(5):1137-42.

42. Shanmugalingam R, Hennessy A, Makris A. Aspirin in the prevention of preeclampsia: the conundrum of how, who and when. *J Hum Hypertens.* 2019;33(1):1-9.

43. Herraiz I, Simon E, Gomez-Arriaga PI, Martinez-Moratalla JM, Garcia-Burguillo A, Jimenez EA, et al. Angiogenesis-Related Biomarkers (sFlt-1/PLGF) in the Prediction and Diagnosis of Placental Dysfunction: An Approach for Clinical Integration. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):19009-26.

44. Saudan P, Brown MA, Buddle ML, Jones M. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105(11):1177-84.

45. Melamed N, Ray JG, Hladunewich M, Cox B, Kingdom JC. Gestational hypertension and preeclampsia: are they the same disease? *J Obstet Gynaecol Can.* 2014;36(7):642-7.

46. Barton JR, O'Brien J M, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(5):979-83.

47. Figueras F, Gratacos E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):86-98.

48. Suzuki S, Yoneyama Y, Sawa R, Otsubo Y, Takeuchi T, Araki T. Relation between serum uric acid and plasma adenosine levels in women with preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2001;51(3):169-72.

49. Powers RW, Bodnar LM, Ness RB, Cooper KM, Gallaher MJ, Frank MP, et al. Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(1):160 e1-8.

50. Watanabe K, Mori T, Iwasaki A, Kimura C, Matsushita H, Shinohara K, et al. Increased oxidant generation in the metabolism of hypoxanthine to uric acid and endothelial dysfunction in early-onset and late-onset preeclamptic women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(12):2662-6.

51. Chen Q, Lau S, Tong M, Wei J, Shen F, Zhao J, et al. Serum uric acid may not be involved in the development of preeclampsia. *J Hum Hypertens*. 2016;30(2):136-40.
52. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res*. 2000;47(1):38-48.
53. Kale A, Kale E, Yalinkaya A, Akdeniz N, Canoruç N. The comparison of amino-terminal probrain natriuretic peptide levels in preeclampsia and normotensive pregnancy. *J Perinat Med*. 2005;33(2):121-4.
54. Tihtonen KM, Kööbi T, Vuolteenaho O, Huhtala HS, Uotila JT. Natriuretic peptides and hemodynamics in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(4):328 e1-7.
55. Anderson UD, Olsson MG, Kristensen KH, Åkerström B, Hansson SR. Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta*. 2012;33 Suppl:S42-7.
56. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672-83.
57. Crispi F, Llurba E, Dominguez C, Martin-Gallan P, Cabero L, Gratacos E. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;31(3):303-9.
58. Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive Value of Maternal Angiogenic Factors in Second Trimester Pregnancies With Abnormal Uterine Perfusion. *Hypertension*. 2007;49(4):818-24.
59. Kusanovic JP, Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Mittal P, Vaisbuch E, et al. A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(11):1021-38.
60. Costa SL, Proctor L, Dodd JM, Toal M, Okun N, Johnson JA, et al. Screening for placental insufficiency in high-risk pregnancies: is earlier better? *Placenta*. 2008;29(12):1034-40.
61. Verlohren S, Stepan H, Dechend R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clinical Science*. 2012;122(2):43-52.
62. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):770-5.
63. Baumann MU, Bersinger NA, Mohaupt MG, Raio L, Gerber S, Surbek DV. First-

trimester serum levels of soluble endoglin and soluble fms-like tyrosine kinase-1 as first-trimester markers for late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(3):266 e1-6.

64. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennstrom M, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016;374(1):13-22.

65. Powers RW, Roberts JM, Plymire DA, Pucci D, Datwyler SA, Laird DM, et al. Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia? *Hypertension.* 2012;60(1):239-46.

66. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens.* 2008;21(5):521-6.

67. Loverro G, Pansini V, Greco P, Vimercati A, Parisi AM, Selvaggi L. Indications and outcome for intensive care unit admission during puerperium. *Arch Gynecol Obstet.* 2001;265(4):195-8.

68. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005;365(9461):785-99.

69. Lisonkova S, Sabr Y, Mayer C, Young C, Skoll A, Joseph KS. Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2014;124(4):771-81.

70. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 2. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(24):4037-48.

71. Padidela RN, Bhat V. Neurobehavioral assessment of appropriate for gestational and small for gestational age babies. *Indian Pediatr.* 2003;40(11):1063-8.

72. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):277-84.

73. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(3):287-99.

74. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-478.

75. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-55.

76. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-22.
77. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
78. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1-3):195-207.
79. Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003;136(1):113-26.
80. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(3):327-47.
81. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(2):161-8.
82. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003;90(2):221-32.
83. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1819-28.
84. Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:956792.
85. Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(6 Pt 1):1701-4.
86. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000;157(6):2111-22.
87. Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E, Burton GJ. Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta.* 1997;18(4):295-9.
88. Watson AL, Skepper JN, Jauniaux E, Burton GJ. Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta.* 1998;19(1):27-34.
89. Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, Knight M, Linton EA, Dhir S, et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-

eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105(11):1195-9.

90. Mahmoud F, Abul H, Dashti A, Al-Jassar W, Omu A. Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes mellitus at third trimester of pregnancy. *Acta Med Acad.* 2012;41(2):175-85.

91. Atamer Y, Kocyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;119(1):60-6.

92. Bukhari SA, Rajoka MI, Ibrahim Z, Jalal F, Rana SM, Nagra SA. Oxidative stress elevated DNA damage and homocysteine level in normal pregnant women in a segment of Pakistani population. *Mol Biol Rep.* 2011;38(4):2703-10.

93. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem.* 1981;18(Pt 3):158-62.

94. Loy SL, Kns S, Jm HJ. Increase in maternal adiposity and poor lipid profile is associated with oxidative stress markers during pregnancy. *Prev Med.* 2013;57 Suppl:S41-4.

95. Davidge ST, Hubel CA, Brayden RD, Capeless EC, McLaughlin MK. Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1992;79(6):897-901.

96. Cranfield LM, Gollan JL, White AG, Dormandy TL. Serum antioxidant activity in normal and abnormal subjects. *Ann Clin Biochem.* 1979;16(6):299-306.

97. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EM, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis.* 2004;177(2):391-9.

98. Ahsan T, Banu S, Nahar Q, Ahsan M, Khan MN, Islam SN. Serum trace elements levels in preeclampsia and eclampsia: correlation with the pregnancy disorder. *Biol Trace Elem Res.* 2013;152(3):327-32.

99. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.* 2003;41(3):437-45.

100. Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet.* 1999;354(9181):788-9.

101. Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol.* 2014;5:372.

102. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost.* 2009;7(3):375-84.
103. Hilali N, Kocyigit A, Demir M, Camuzcuoglu A, Incebiyik A, Camuzcuoglu H, et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170(2):377-80.
104. Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Trace elements and antioxidant enzymes associated with oxidative stress in the pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Clin Nutr.* 2012;31(6):946-50.
105. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta.* 2009;30 Suppl A:S43-8.
106. Wikstrom AK, Nash P, Eriksson UJ, Olovsson MH. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201(6):597 e1-8.
107. Yung HW, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol.* 2008;173(2):451-62.
108. Mertz W. Human requirements: basic and optimal. *Ann N Y Acad Sci.* 1972;199:191-201.
109. Reinhold JG. Trace elements--a selective survey. *Clin Chem.* 1975;21(4):476-500.
110. Parisi AF, Vallee BL. Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine. *Am J Clin Nutr.* 1969;22(9):1222-39.
111. Roberts JM, Balk JL, Bodnar LM, Belizan JM, Bergel E, Martinez A. Nutrient involvement in preeclampsia. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 2):1684S-92S.
112. Al-Jameil N, Tabassum H, Al-Mayouf H, Aljohar HI, Alenzi ND, Hijazy SM, et al. Analysis of serum trace elements-copper, manganese and zinc in preeclamptic pregnant women by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: a prospective case controlled study in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):1900-10.
113. McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ. Selenium: an essential element for immune function. *Immunol Today.* 1998;19(8):342-5.
114. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W, Maciag A, Marchaluk E. Changes in

blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1993;35(1):12-7.

115. Prohaska JR, Brokate B. Lower copper, zinc-superoxide dismutase protein but not mRNA in organs of copper-deficient rats. *Arch Biochem Biophys.* 2001;393(1):170-6.

116. O'Brien KO, Zavaleta N, Caulfield LE, Wen J, Abrams SA. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women. *J Nutr.* 2000;130(9):2251-5.

117. Bader AA HT, Mosawi MA, Otaibi M, Abul H, Khalifa D, Dashti H. Serum zinc and copper concentrations in pregnant women from Kuwait. *J Trace Elem Exp Med* 1997;10(4):209-215.

118. Ashraf M, Nasarullah M, Salam A, Khurshid R, Ahmed Z. Maternal serum zinc concentration in gravidae suffering from preeclampsia. *AMPC* 2007;1(1):24-7.

119. Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, DuBard M. Maternal plasma zinc concentrations and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1):109-13.

120. Cannata-Andía JB R-GM, Gómez-Alonso C. Mecanismo de acción del ranelato de estroncio. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2010;2(Supl 1):85-9.

121. Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol Ther.* 2012;136(2):216-26.

122. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2004;350(5):459-68.

123. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2816-22.

124. Abrahamsen B, Grove EL, Vestergaard P. Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):757-62.

125. Osborne V, Layton D, Perrio M, Wilton L, Shakir SA. Incidence of venous thromboembolism in users of strontium ranelate: an analysis of data from a prescription-event monitoring study in England. *Drug Saf.* 2010;33(7):579-91.

126. Cooper C, Fox KM, Borer JS. Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: a nested case-control study in the CPRD. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):737-45.

127. [Available from: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2014/docs/NI-MUH_FV_01-2014-ranelato-estroncio.pdf
128. Silberstein T, Saphier M, Mashiach Y, Paz-Tal O, Saphier O. Elements in maternal blood and amniotic fluid determined by ICP-MS. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(1):88-92.
129. Wang Y, Tan M, Huang Z, Sheng L, Ge Y, Zhang H, et al. Elemental contents in serum of pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res.* 2002;88(2):113-8.
130. Suliburska J, Kocylowski R, Komorowicz I, Grzesiak M, Bogdanski P, Baralkiewicz D. Concentrations of Mineral in Amniotic Fluid and Their Relations to Selected Maternal and Fetal Parameters. *Biol Trace Elem Res.* 2016;172(1):37-45.
131. Markiewicz B, Sajnog A, Lorenc W, Hanc A, Komorowicz I, Suliburska J, et al. Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty. *Talanta.* 2017;174:122-30.
132. Jalali LM, Koski KG. Amniotic fluid minerals, trace elements, and prenatal supplement use in humans emerge as determinants of fetal growth. *J Trace Elem Med Biol.* 2018;50:139-45.
133. Kim J, Kim YJ, Lee R, Moon JH, Jo I. Serum levels of zinc, calcium, and iron are associated with the risk of preeclampsia in pregnant women. *Nutr Res.* 2012;32(10):764-9.
134. Sarwar MS, Ahmed S, Ullah MS, Kabir H, Rahman GK, Hasnat A, et al. Comparative study of serum zinc, copper, manganese, and iron in preeclamptic pregnant women. *Biol Trace Elem Res.* 2013;154(1):14-20.
135. Rayman MP, Wijnen H, Vader H, Kooistra L, Pop V. Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth. *CMAJ.* 2011;183(5):549-55
136. Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103(2):130-2.
137. Rayman MP, Searle E, Kelly L, Johnsen S, Bodman-Smith K, Bath SC, et al. Effect of selenium on markers of risk of pre-eclampsia in UK pregnant women: a randomised, controlled pilot trial. *Br J Nutr.* 2014;112(1):99-111.
138. Tara F, Rayman MP, Boskabadi H, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, Yazarlu O, et al. Selenium supplementation and premature (pre-labour) rupture of membranes:

a randomised double-blind placebo-controlled trial. *J Obstet Gynaecol.* 2010;30(1):30-4.

139. Rezende VB, Barbosa F, Palei AC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE, Sandrim VC. Correlations among antiangiogenic factors and trace elements in hypertensive disorders of pregnancy. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;29:130-5.

140. Álvarez-Fernández I, Prieto B, Rodríguez V, Ruano Y, Escudero AI, Álvarez FV. New biomarkers in diagnosis of early onset preeclampsia and imminent delivery prognosis. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(8):1159-68.

141. Alvarez-Fernandez I, Prieto B, Rodriguez V, Ruano Y, Escudero AI, Alvarez FV. Role of vitamin D and sFlt-1/PlGF ratio in the development of early- and late-onset preeclampsia. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(7):1033-40.

142. Alvarez-Fernandez I, Prieto B, Rodriguez V, Ruano Y, Escudero AI, Alvarez FV. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and angiogenic biomarkers in the prognosis of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2016;463:150-7.

143. Sabria E, Lequerica-Fernandez P, Ganuza PL, Angeles EE, Escudero AI, Martinez-Morillo E, et al. Use of the sFlt-1/PlGF ratio to rule out preeclampsia requiring delivery in women with suspected disease. Is the evidence reproducible? *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(2):303-11.

144. Liu X, Zhang Y, Piao J, Mao D, Li Y, Li W, et al. Reference Values of 14 Serum Trace Elements for Pregnant Chinese Women: A Cross-Sectional Study in the China Nutrition and Health Survey 2010-2012. *Nutrients.* 2017;9(3):309.

145. Tabrizi FM, Pakdel FG. Serum Level of Some Minerals during Three Trimesters of Pregnancy in Iranian Women and Their Newborns: A Longitudinal Study. *Indian J Clin Biochem.* 2014;29(2):174-80.

146. Liu J, Yang H, Shi H, Shen C, Zhou W, Dai Q, et al. Blood copper, zinc, calcium, and magnesium levels during different duration of pregnancy in Chinese. *Biol Trace Elem Res.* 2010;135(1-3):31-7.

147. Butler JA, Whanger PD, Tripp MJ. Blood selenium and glutathione peroxidase activity in pregnant women: comparative assays in primates and other animals. *Am J Clin Nutr.* 1982;36(1):15-23.

148. Tan M, Sheng L, Qian Y, Ge Y, Wang Y, Zhang H, et al. Changes of serum selenium in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res.* 2001;83(3):231-7.

149. Ferrer E, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ, Monleon J. Whole blood selenium content in pregnant women. *Sci Total Environ.* 1999;227(2-3):139-43.

150. Khoushabi F, Shadan MR, Miri A, Sharifi-Rad J. Determination of Maternal Serum Zinc, Iron, Calcium and Magnesium during Pregnancy in Pregnant Women and Umbilical Cord Blood and Their Association with Outcome of Pregnancy. *Mater Sociomed.* 2016;28(2):104-7.
151. Basu A, Yu JY, Jenkins AJ, Nankervis AJ, Hanssen KF, Henriksen T, et al. Trace elements as predictors of preeclampsia in type 1 diabetic pregnancy. *Nutr Res.* 2015;35(5):421-30.
152. Ruiz NF, Meertens L, Pena E, Sanchez A, Solano L. Behavior of serum zinc levels during pregnancy. *Arch Latinoam Nutr.* 2005;55(3):235-44.
153. Farzin L, Sajadi F. Comparison of serum trace element levels in patients with or without pre-eclampsia. *J Res Med Sci.* 2012;17(10):938-41.
154. Sanchez-Ramos L, Sandroni S, Andres FJ, Kaunitz AM. Calcium excretion in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1991;77(4):510-3.
155. Belizan JM, Villar J, Gonzalez L, Campodonico L, Bergel E. Calcium supplementation to prevent hypertensive disorders of pregnancy. *N Engl J Med.* 1991;325(20):1399-405.
156. Udenze IC, Arikawe AP, Azinge EC, Okusanya BO, Ebuehi OA. Calcium and Magnesium Metabolism in Pre-Eclampsia. *West Afr J Med.* 2014;33(3):178-82.
157. Grynepas MD, Marie PJ. Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. *Bone.* 1990;11(5):313-9.
158. Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res.* 1996;11(9):1302-11.
159. Skoryna SC. Effects of oral supplementation with stable strontium. *Can Med Assoc J.* 1981;125(7):703-12.
160. Salles JP. Bone metabolism during pregnancy. *Ann Endocrinol (Paris).* 2016;77(2):163-8.
161. Namgung R, Tsang RC. Bone in the pregnant mother and newborn at birth. *Clin Chim Acta.* 2003;333(1):1-11.
162. Ulrich U, Miller PB, Eyre DR, Chesnut CH, 3rd, Schlebusch H, Soules MR. Bone remodeling and bone mineral density during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2003;268(4):309-16.

163. Shaarawy M, Zaki S, Ramzi AM, Salem ME, El-Minawi AM. Feto-maternal bone remodeling in normal pregnancy and preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(5):343-8.
164. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Jones J, Alagband-Zadeh J, Steer PJ, Johnson MR. A longitudinal study of biochemical markers of bone turnover during normal pregnancy and pregnancies complicated by pre-eclampsia. *BJOG.* 2002;109(6):708-13.
165. Kumar A, Devi SG, Prasad S, Kapoor S, Sharma S. Bone turnover in preeclampsia-complicated pregnancy in North Indian women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012;38(1):172-9.
166. van den Berkhof YS, Gant CM, Maatman R, De Graaf A, Navis GJ, Bakker SJL, et al. Correlations between plasma strontium concentration, components of calcium and phosphate metabolism and renal function in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(9):e12987.
167. Pors Nielsen S. The biological role of strontium. *Bone.* 2004;35(3):583-8.
168. Permyakov EA, Kretsinger RH. Nonessential metals. En: Uversky VN, editor. *Calcium Binding Proteins.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.p. 189-219.
169. Permyakov EA, Kretsinger RH. Interactions of calcium binding proteins with other metal ions. En: Uversky VN, editor. *Calcium Binding Proteins.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.p. 440-455.
170. Briana DD, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Vraila VM, et al. Perinatal bone turnover in term pregnancies: the influence of intrauterine growth restriction. *Bone.* 2008;42(2):307-13.
171. Briana DD, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A. Circulating osteoprotegerin and sRANKL concentrations in the perinatal period at term. The impact of intrauterine growth restriction. *Neonatology.* 2009;96(2):132-6.
172. Dumanskiy YV, Syniachenko OV, Stepko PA, Taktashov GS, Chernyshova OY, Stoliarova OY. The state of bone metabolism in lung cancer patients. *Exp Oncol.* 2018;40(2):136-9.
173. Syniachenko OV, Dumanckiy YV, Yehudina YD, Bevzenko TB, Yarmola TI. Bone tissue lesion in oncological disease (literature review and own research data). *Wiad Lek.* 2018;71(6):1262-6.
174. 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.

175. 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. *Am J Hypertens*. 2012;25(6):711-7.
176. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(6):615-31.
177. Maples KR, Mason RP. Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem*. 1988;263(4):1709-12.
178. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric Acid as a Pathogenic Factor in Preeclampsia. *Placenta*. 2008;29:67-72.
179. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol*. 2009;587(Pt 14):3453-8.
180. Rashid CS, Bansal A, Simmons RA. Oxidative Stress, Intrauterine Growth Restriction, and Developmental Programming of Type 2 Diabetes. *Physiology (Bethesda)*. 2018;33(5):348-59.
181. Yalin S, Sagir O, Comelekoglu U, Berkoz M, Eroglu P. Strontium ranelate treatment improves oxidative damage in osteoporotic rat model. *Pharmacol Rep*. 2012;64(2):396-402.
182. Lu S, Ren L, Fang J, Ji J, Liu G, Zhang J, et al. Trace elements are associated with urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level: a case study of college students in Guangzhou, China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(9):8484-91.
183. Jiang H, Guan Q, Xiao Y, Feng Z, Yu G, Pan Q. Strontium Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in a Nonalcoholic Fatty Liver Disease Model. *J Med Food*. 2018;21(12):1-10
184. Bai Y, Feng W, Wang S, Zhang X, Zhang W, He M, et al. Essential Metals Zinc, Selenium, and Strontium Protect against Chromosome Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure. *Environ Sci Technol*. 2016;50(2):951-60.
185. Valavanidis A, Fiotakis K, Bakeas E, Vlahogianni T. Electron paramagnetic resonance study of the generation of reactive oxygen species catalysed by transition metals and quinoid redox cycling by inhalable ambient particulate matter. *Redox Rep*. 2005;10(1):37-51.
186. Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J, Santalo-Bel M, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J*. 2006;27(3):330-7.

187. Lang RM, Pridjian G, Feldman T, Neumann A, Lindheimer M, Borow KM. Left ventricular mechanics in preeclampsia. *Am Heart J.* 1991;121(6 Pt 1):1768-75.
188. Stoupakis G, Klapholz M. Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure. *Heart Dis.* 2003;5(3):215-23.
189. Shen P, Gong Y, Wang T, Chen Y, Jia J, Ni S, et al. Expression of osteoprotegerin in placenta and its association with preeclampsia. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e44340.
190. Mierzynski R, Dluski D, Darmochwal-Kolarz D, Poniedzialek-Czajkowska E, Leszczynska-Gorzalak B, Kimber-Trojnar Z, et al. Intra-uterine Growth Retardation as a Risk Factor of Postnatal Metabolic Disorders. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(7):587-96.
191. Iacovidou N, Briana DD, Boutsikou M, Gourgiotis D, Baka S, Vraila VM, et al. Perinatal changes of circulating N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in normal and intrauterine-growth-restricted pregnancies. *Hypertens Pregnancy.* 2007;26(4):463-71.
192. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(2):161 e1-11.
193. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63(2):346-52.
194. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006;355(10):992-1005.
195. Zhu X, Kong Y, Huang Y, Zhao B, Wang J. Influence of Strontium on Vascular Endothelial Growth Factor and Fibroblast Growth Factor 2 Expression in Rat Chondrocytes Cultured In Vitro. *Biol Trace Elem Res.* 2018; [Epub ahead of print].
196. Chen Y, Zheng Z, Zhou R, Zhang H, Chen C, Xiong Z, et al. Developing a Strontium-Releasing Graphene Oxide-/Collagen-Based Organic-Inorganic Nanobiocomposite for Large Bone Defect Regeneration via MAPK Signaling Pathway. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(17):15986-97.
197. Wang G, Roohani-Esfahani SI, Zhang W, Lv K, Yang G, Ding X, et al. Effects of Sr-HT-Gahnite on osteogenesis and angiogenesis by adipose derived stem cells for critical-sized calvarial defect repair. *Sci Rep.* 2017;7:41135.

198. Zhao F, Lei B, Li X, Mo Y, Wang R, Chen D, et al. Promoting in vivo early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes. *Biomaterials*. 2018;178:36-47.
199. Zhang W, Cao H, Zhang X, Li G, Chang Q, Zhao J, et al. A strontium-incorporated nanoporous titanium implant surface for rapid osseointegration. *Nanoscale*. 2016;8(9):5291-301.
200. Mao L, Xia L, Chang J, Liu J, Jiang L, Wu C, et al. The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Acta Biomater*. 2017;61:217-32.
201. Lafayette RA, Druzin M, Sibley R, Derby G, Malik T, Huie P, et al. Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia. *Kidney Int*. 1998;54(4):1240-9.
202. Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM. Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(3):648-52.
203. Davison JM, Dunlop W. Renal hemodynamics and tubular function normal human pregnancy. *Kidney Int*. 1980;18(2):152-61.
204. Sims EA, Krantz KE. Serial studies of renal function during pregnancy and the puerperium in normal women. *J Clin Invest*. 1958;37(12):1764-74.
205. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int*. 2005;67(6):2101-13.
206. Yang F, Yi X, Guo J, Xu S, Xiao Y, Huang X, et al. Association of plasma and urine metals levels with kidney function: A population-based cross-sectional study in China. *Chemosphere*. 2019;226:321-8.

