

CRISTINA WIDE PISSETTI<sup>1</sup>

THIAGO MANTELLO BIANCO<sup>2</sup>

SARAH CRISTINA SATO VAZ TANAKA<sup>2</sup>

GABRIEL ANTONIO NOGUEIRA NASCENTES<sup>3</sup>

ROSEANE LOPES DA SILVA GRECCO<sup>4</sup>

SUELI RIUL DA SILVA<sup>5</sup>

MARLY APARECIDA SPADOTTO BALARIN<sup>4</sup>

# Papel protetor do alelo G do polimorfismo no gene Interleucina 10 (-1082G/A) contra o desenvolvimento de pré-eclâmpsia

*Protective role of the G allele of the polymorphism in the Interleukin 10 gene (-1082G/A) against the development of preeclampsia*

## Palavras-chave

Polimorfismo genético  
Pré-eclâmpsia  
Interleucina-10

## Keywords

Genetic polymorphism  
Pre-eclampsia  
Interleukin-10

## Resumo

**OBJETIVOS:** Identificar a frequência do polimorfismo no gene *IL-10*, rs1800896 (-1082 A/G), em mulheres com pré-eclâmpsia (PE) e em mulheres do grupo controle e associar a presença deste polimorfismo com a proteção contra o desenvolvimento da PE. **MÉTODOS:** Estudo do tipo caso-controle, no qual foram selecionadas 54 mulheres com PE, classificadas de acordo com os critérios da *National High Blood Pressure Education Program* e 172 mulheres do grupo controle, com pelo menos duas gestações saudáveis. O polimorfismo proposto foi estudado utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), com sondas de hidrólise. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de associação do  $\chi^2$ . *Odds ratio* e seu intervalo de confiança de 95% foram usados para medir a força de associação entre o polimorfismo estudado e o desenvolvimento da PE. **RESULTADOS:** Foi observado aumento significativo da frequência do genótipo AG entre mulheres do grupo controle (85 versus 15% nas mulheres com PE). O alelo G é significativamente mais frequente entre as mulheres do grupo controle do que nas com PE (Teste  $\chi^2$ ;  $p=0,01$ ). O *odds ratio* para as portadoras do alelo G foi de 2,13, indicando que apresentam menor risco de desenvolver PE do que as não portadoras. **CONCLUSÕES:** Sugere-se associação entre a presença do alelo G do polimorfismo no gene *IL-10*, rs1800896 (-1082 A/G), e a proteção contra o desenvolvimento da PE. Mais estudos sobre a contribuição dessas variações e os mecanismos pelos quais afetam o risco de desenvolver PE ainda necessitam de ser realizadas.

## Abstract

**PURPOSE:** To identify the frequency of polymorphism in the *IL-10* gene, rs1800896 (-1082 A/G), in women with preeclampsia (PE) and in women in a control group and to associate the presence of this polymorphism with protection against the development of PE. **METHODS:** This was a case-control study conducted on 54 women with PE, classified according to the criteria of the *National High Blood Pressure Education Program*, and on 172 control women with at least two healthy pregnancies. The proposed polymorphism was studied by the technique of real time polymerase chain reaction (qPCR), with hydrolysis probes. Statistical analysis was performed using the  $\chi^2$  test. Odds ratio and confidence interval of 95% were used to measure the strength of association between the studied polymorphism and the development of PE. **RESULTS:** Statistically increased frequency of the AG genotype was observed among control women (85 versus 15% in women with PE). The G allele was significantly more frequent among control women than PE women ( $\chi^2$  test,  $p = 0.01$ ). The odds ratio for carriers of the G allele was 2.13, indicating a lower risk of developing PE compared to non-carriers. **CONCLUSIONS:** Thus, an association is suggested to occur between the presence of the G allele of the polymorphism in the *IL-10* rs1800896 (-1082 A/G) gene and protection against the development of PE. More studies investigating the contribution of these variations and the mechanisms by which they affect the risk of developing PE still need to be undertaken.

## Correspondência

Cristina Wide Pissetti  
Praça Manoel Terra, 330 – Centro  
CEP: 38015-050  
Uberaba (MG), Brasil

## Recebido

01/07/2014

## Aceito com modificações

19/08/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005075

Disciplina de Genética, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Atenção à Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

<sup>3</sup>Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba (MG), Brasil.

<sup>4</sup>Disciplina de Genética, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

<sup>5</sup>Disciplina Enfermagem em Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

## Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma desordem multissistêmica de etiologia desconhecida, que ocorre em cerca de 5% de todas as gestações. Pode se manifestar como síndrome materna, através de hipertensão, proteinúria com ou sem alterações em vários sistemas, ou como síndrome fetal, apresentando restrição do crescimento fetal, diminuição de líquido amniótico e alteração de oxigenação<sup>1</sup>. É uma condição hipertensiva exclusiva da gestação<sup>2</sup>, geralmente, diagnosticada na presença de hipertensão associada à proteinúria. Pressão arterial sistólica de pelo menos 140 mm Hg e pressão diastólica de pelo menos 90 mm Hg em, no mínimo, dois momentos diferentes, com intervalo de 4 a 6 horas, após a vigésima semana de gestação, em mulheres previamente normotensas são critérios patognomônicos de hipertensão. Já a proteinúria é definida pela excreção de proteínas em níveis superiores ou iguais a 300 mg/24 h<sup>3</sup>. Em casos mais graves, as pacientes podem apresentar insuficiência renal, insuficiência hepática, edema pulmonar, crises convulsivas (eclâmpsia), hemólise e/ou trombocitopenia. A insuficiência hepática, hemólise e trombocitopenia caracterizam a síndrome HELLP (sigla em inglês para *haemolysis, elevated enzymes liver and low platelets*), podendo ser um importante agravante na pré-eclâmpsia<sup>4</sup>.

Embora a causa da PE permaneça desconhecida, muitas hipóteses foram propostas<sup>5</sup>. Uma das mais fortemente aceitas baseia-se no distúrbio da função placentária no início da gestação<sup>4</sup>, quando ocorreriam anormalidades no processo inflamatório, comum a todas as mulheres na segunda metade da gestação. A desordem seria, portanto, o resultado final da resposta inflamatória sistêmica contra a gestação. Fatores como aumento do tamanho da placenta, estímulo anormal gerado por uma placenta pequena ou uma resposta materna exagerada a essas situações, que podem aumentar a resposta inflamatória sistêmica materna à gestação, predisporiam à PE<sup>6</sup>. Dois componentes principais poderiam ser causadores da resposta inflamatória exacerbada: o estímulo excessivo ou a resposta materna exagerada à presença da placenta<sup>7</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, muitos estudos têm indicado que a PE é uma doença associada a forte predisposição familiar, e que varia também de acordo com características geográficas, socioeconômicas e raciais da amostra analisada<sup>8,9</sup>. Somado a isso, foram descritos *loci* de suscetibilidade ao desenvolvimento da PE em diferentes populações. Em famílias da Austrália e Nova Zelândia, foram identificados dois *loci*: 2p12 e 2q23<sup>10</sup>. Já em famílias da Finlândia, os *loci* identificados foram os 2p25 e 9p13<sup>11</sup>. Para a maioria da população, no entanto, a PE parece representar uma desordem genética complexa e ocorre como resultado de numerosas variantes comuns em diferentes *loci* que, individualmente, têm

pequeno efeito, mas coletivamente contribuem para a suscetibilidade à doença<sup>12</sup>.

Embora o genótipo paterno pareça exercer influência no aparecimento da PE, a maioria dos estudos genéticos baseia-se apenas no genótipo materno e para tal, a estratégia de genes candidatos tem sido muito empregada. Nesse sentido, genes envolvidos com a homeostase materna e sistema cardiovascular ou relacionados à regulação da resposta inflamatória materna têm sido estudados<sup>9,13,14</sup>. Assim, torna-se importante investigar polimorfismos em genes de citocinas que poderão ser úteis como marcadores moleculares de suscetibilidade/resistência ao desenvolvimento da PE.

A Interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, cujas principais fontes são as células Th2, tem provável papel contra o desenvolvimento da PE. Foi observado que mulheres com PE apresentaram níveis séricos de IL-10 significativamente mais baixos do que mulheres que não desenvolveram PE<sup>14</sup>, sugerindo um papel protetor para a IL-10. Vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) foram descritos na região promotora do gene IL-10<sup>15</sup>. Variações genotípicas na região promotora do gene IL-10 podem ser responsáveis pelas diferenças interindividuais na produção de IL-10 e, conseqüentemente à suscetibilidade ao desenvolvimento da PE. Mesmo com os avanços nos estudos em PE, sua etiopatologia permanece desconhecida, com poucos trabalhos na literatura associando polimorfismos genéticos no gene IL-10 com a PE<sup>14,16,17</sup>.

Este trabalho teve como objetivos identificar a frequência do polimorfismo no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G) em mulheres com PE e em mulheres do grupo controle (normotensas), além de buscar associação entre a presença deste polimorfismo e a possível proteção contra o desenvolvimento da PE.

## Métodos

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, do qual foram selecionadas 226 mulheres, distribuídas em dois grupos: pré-eclâmpsia (grupo caso; n=54) e controle (n=172), provenientes da região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. As participantes do estudo foram recrutadas entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013. As mulheres com pré-eclâmpsia foram atendidas e diagnosticadas no setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). O diagnóstico foi baseado nos critérios estabelecidos pelo *National High Blood Pressure Education Program*<sup>3</sup>. As mulheres do grupo controle, normotensas, haviam apresentado duas ou mais gestações, levadas a termo, com filhos saudáveis e sem intercorrências. Foram incluídas no estudo apenas mulheres com mais de 18 anos de idade. A caracterização da amostra foi

realizada mediante entrevista pré-estruturada com as participantes da pesquisa e complementada por dados transcritos dos prontuários.

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de todas as participantes do estudo. O DNA genômico foi extraído de leucócitos pela técnica de Fenol-Clorofórmio<sup>18</sup>.

Para amplificação das sequências e determinação dos genótipos, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando o sistema de sondas de hidrólise (Identificação do ensaio: C\_\_\_553275\_20; TaqMan® Applied Biosystem), segundo as recomendações do fabricante. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos de amplificação (92°C por 15 segundos e 60°C por um minuto). Para cada ciclo, o *software* determinava o sinal fluorescente emitido pelas sondas marcadas com VIC ou FAM. As amostras foram processadas pelo sistema de PCR Real-Time 7300 (Applied Biosystems).

Para a análise estatística, os dados foram compilados no *software* Excel® 4.0, utilizando-se sua planilha eletrônica para armazenamento. A análise estatística dos resultados foi realizada de forma descritiva e inferencial. Para variáveis quantitativas, utilizaram-se medidas de posição ou centralidade (média) e medidas de dispersão e variabilidade (desvio padrão). As variáveis categóricas foram analisadas por meio do *software* SPSS, versão 16.0, empregando-se frequências relativas, bem como análise de associação em tabelas de contingências  $\chi^2$ . *Odds ratio* (OD) e seu intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram usados para medir a força de associação entre o polimorfismo estudado e o desenvolvimento da PE. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Protocolo CEP nº 1115-08, em 18 de abril de 2008.

## Resultados

A amostra total foi composta por 226 mulheres, sendo 172 (76%) do grupo controle e 54 (24%) com PE, com faixa etária entre 21 e 51 anos. O grupo controle apresentou faixa etária maior ou igual a 40 anos, enquanto que no grupo com PE, a faixa etária foi inferior a 40 anos. As mulheres do grupo controle haviam tido, em média, de três a cinco gestações, e as mulheres do grupo com PE tiveram de uma a três gestações, como pode ser observado na Tabela 1.

Em relação à análise da frequência genotípica para o polimorfismo no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G), foram analisadas 226 mulheres. Das 82 mulheres com o genótipo AA, 55 (67,1%) são do grupo controle e 27 (32,9%) do grupo com PE. O genótipo

AG foi observado em 120 mulheres, sendo 102 (85%) do grupo controle e 18 (15%) do grupo com PE. Foi observado que 24 mulheres apresentaram o genótipo GG, das quais 15 (62,5%) do grupo controle e nove (37,5%) do grupo com PE. Houve diferenças significativas na frequência dos genótipos quando o grupo de mulheres com PE foi comparado com o grupo controle (Teste  $\chi^2$ ;  $p=0,003$ ). Pode-se observar que os genótipos AG e GG foram mais frequentes no grupo controle do que no grupo com PE. Esses resultados estão apresentados na Tabela 2.

Foi realizada, ainda, uma análise para a presença do alelo G. Foram agrupados como “presença do alelo G” os genótipos AG e GG, e como ausência de G o genótipo AA. A ausência do alelo G foi verificada em 82 mulheres, sendo 55 (67%) do grupo controle e 27 (33%) do grupo com PE. Observou-se a presença do alelo G em 144 mulheres, sendo 117 (81,2%) do grupo controle e 27 (18,8%) do grupo com PE. O alelo G é significativamente mais frequente nas mulheres do grupo controle do que no grupo com PE (Teste  $\chi^2$ ;  $p=0,01$ ). A razão de chance (*odds ratio*) para as portadoras do alelo G foi de 2,13 (IC95% 1,14–3,96), sugerindo menor risco de desenvolver PE do que as não portadoras. Os dados estão representados na Tabela 3.

**Tabela 1.** Distribuição da idade, número de gestações e número de abortos em mulheres com pré-eclâmpsia e grupo controle

	Grupo	
	Controle	Pré-eclâmpsia
Média de idade±DP	40,1±11,5	28,4±7,0
Menos de 40 anos	72/120	48/120
40 anos ou mais	66/68	2/68
número de gestações±DP	3,4±1,5	2,0±1,2

DP: desvio padrão

**Tabela 2.** Distribuição das frequências dos genótipos do polimorfismo no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G), em mulheres com pré-eclâmpsia e grupo controle

Genótipo	Pré-eclâmpsia		Grupo controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
AA	27	32,9	55	67,1	82	100
AG	18	15,0	102	85,0	120	100
GG	9	37,5	15	62,5	24	100
Total	54	24,0	172	76,0	226	100

**Tabela 3.** Distribuição da frequência do alelo G do polimorfismo no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G), em mulheres com pré-eclâmpsia e do grupo controle

Alelo G	Pré-eclâmpsia		Grupo controle		Total		OR (IC95%)	Valor p*
	n	%	n	%	n	%		
Ausência	27	33,0	55	67,0	82	100	1,0	0,01
Presença	27	18,8	117	81,2	144	100	2,1 (1,1–3,9)	
Total	54	24,0	172	76,0	226	100		

Sendo significativo quando  $p < 0,05$

## Discussão

Neste trabalho, foi estudado o polimorfismo genético no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G) e sua associação com a proteção contra o desenvolvimento de PE. Alguns estudos, em diferentes populações, pesquisaram esse mesmo polimorfismo, sendo a maioria dos resultados divergentes dos obtidos na população aqui analisada<sup>16,17,19-24</sup>.

Os resultados obtidos sugerem importante associação do polimorfismo no gene IL-10 rs1800896 (-1082 A/G) com a proteção contra o desenvolvimento da PE ( $\chi^2$ ;  $p=0,003$ ), com maior frequência dos genótipos AG e GG entre as mulheres do grupo controle. Esse resultado foi comprovado quando os genótipos AG e GG foram agrupados em “presença de G”, com maior frequência deste alelo entre o grupo controle. O OR observado foi de 2,13, sugerindo que as mulheres portadoras do alelo G carregam duas vezes menos risco de desenvolver a PE do que as não portadoras.

Em estudo realizado com mulheres norte-americanas, não foi observada associação entre o polimorfismo no gene IL-10 e o desenvolvimento da PE<sup>19</sup>. Resultados semelhantes foram encontrados na Áustria<sup>22,23</sup> e na Índia<sup>16,17</sup>. Entretanto, em mulheres iranianas, foi observada frequência aumentada do alelo -1082G no grupo com PE<sup>21</sup>.

Por outro lado, pesquisa anterior com mulheres brasileiras identificou frequência diminuída do genótipo -1082GG em mulheres brancas com PE em relação ao grupo controle<sup>20</sup>, dados semelhantes aos observados no

presente estudo. Já trabalho realizado na Turquia encontrou associação entre o genótipo -1082AA e o risco de desenvolver PE. As diferenças observadas entre os estudos, provavelmente, devem-se à população estudada (*background* genético), número amostral e variedade clínica dos casos que foram estudados<sup>25</sup>.

Estudos como este buscam associar a presença de polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da PE, no intuito, principalmente, de encontrar marcadores moleculares que sejam úteis na identificação precoce de mulheres com predisposição para o desenvolvimento de PE. É válido ressaltar que os dados apresentados devem ser confirmados em populações com diferentes *backgrounds* genéticos, além de estudos funcionais que comprovem associação do genótipo e/ou alelo com o fenótipo (PE). Pela falta de esclarecimentos acerca da etiologia da PE, estratégias efetivas de prevenção e tratamento ainda devem ser desenvolvidas<sup>25</sup>.

Sugere-se, portanto, que portadoras do alelo G do polimorfismo no gene IL-10, rs1800896 (-1082 A/G) possuam menor risco de desenvolver PE. Mais estudos investigando a contribuição dessas variações e os mecanismos pelos quais afetam o risco de desenvolver PE ainda necessitam de ser realizadas.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro (nº CBB\APQ000838-11, PIBIC/FAPEMIG).

## Referências

- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
- Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:173-92.
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):S1-S22.
- Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
- Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1999;42(3):422-35.
- Redman CW, Sargent IL. The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil*. 2001;29(7-8):518-22.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(2 Pt 1):499-506.
- Bezerra PC, Leão MD, Queiroz JW, Melo EM, Pereira FV, Nóbrega MH, et al. Family history of hypertension as an important risk factor for the development of severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010;89(5):612-7.
- Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *J Pregnancy*. 2012;2012:632732.
- Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet*. 2000;67(6):1581-5.
- Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Häivä-Mällinen L, Sundström H, et al. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):168-77.
- Williams PJ, Broughton Pipkin F. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(4):405-17.
- Serrano NC. Immunology and genetic of preeclampsia. *Clin Dev Immunol*. 2006;13(2-4):197-201.

14. Xie C, Yao MZ, Liu JB, Xiong LK. A meta-analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 in preeclampsia. *Cytokine*. 2011;56(3):550-9.
15. Kalkunte S, Nevers T, Norris WE, Sharma S. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):165-9.
16. Sowmya S, Manjari KS, Ramaiah A, Sunitha T, Nallari P, Jyothy A, et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with early onset preeclampsia. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jun 24. [Epub ahead of print]
17. Sowmya S, Ramaiah A, Sunitha T, Nallari P, Jyothy A, Venkateshwari A. Evaluation of interleukin-10 (G-1082A) promoter polymorphism in preeclampsia. *J Reprod Infertil*. 2013;14(2):62-6.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
19. Haggerty CL, Ferrell RE, Hubel CA, Markovic N, Harger G, Ness RB. Association between allelic variants in cytokine genes and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(1):209-15.
20. Daher S, Sass N, Oliveira LG, Mattar R. Cytokine genotyping in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2006;55(2):130-5.
21. Kamali-Sarvestani E, Kiany S, Ghahesi-Fard B, Robati M. Association study of IL-10 and IFN-gamma gene polymorphisms in Iranian women with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2006;72(1-2):118-26.
22. Stonek F, Hafner E, Metzenbauer M, Katharina S, Stümpflen I, Schneeberger C, et al. Absence of an association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha G308A, interleukin-6 (IL-6) G174C and interleukin-10 (IL-10) G1082A polymorphism in women with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2008;77(1):85-90.
23. Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, Philipp K, Tempfer C. Interleukin-10 -1082 G/A promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1,616 pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(4):430-3.
24. Vural P, Degirmencioglu S, Saral NY, Demirkan A, Akgul C, Yildirim G, et al. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010;36(1):64-71.
25. Buurma AJ, Turner RJ, Driessen JH, Mooyaart AL, Schoones JW, Buijij JA, et al. Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):289-303.