DÉCIO ROBERTO KAMIO TESHIMA

**Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF):
concentrações séricas e teciduais em gestações
ectópicas ampulares e a profundidade da invasão
trofoblástica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zugaib

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Teshima, Décio Roberto Kamio

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): concentrações séricas e teciduais em gestações ectópicas ampulares e a profundidade da invasão trofoblástica / Décio Roberto Kamio Teshima. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Marcelo Zugaib.

Descritores: 1.Gravidez ectópica 2.Gravidez tubária 3.Fatores de crescimento do endotélio vascular 4.Tubas uterinas 5.Estudos prospectivos

USP/FM/DBD-291/15

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ramon e Elena, por todos os ensinamentos e pelo incentivo incondicional aos estudos desde a minha infância até hoje.

À minha irmã, Letícia, pela presença e carinho.

À minha esposa, Clarissa, mulher da minha vida, pelo companheirismo e amor de cada dia.

Às minhas filhas, Carolina e Fernanda, por serem a razão de tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, digníssimo professor titular do Departamento de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento desde a residência médica e pela oportunidade de realização deste estudo.

Ao Dr. Fabio Roberto Cabar, idealizador deste trabalho, pelas orientações e correções necessárias para a finalização desta tese. Amigo desde os tempos de residência médica e que me estimulou a voltar aos estudos depois de 8 anos.

À Prof. Dra. Rossana Pulcinelli Vieira Francisco e à Prof. Dra Maria de Lourdes Brizot pela participação na banca de qualificação e pelo apoio na pós graduação.

À Dra. Leila Antonângelo pela presteza e profissionalismo na análise do VEGF tecidual e sérico.

À Dra. Regina Schultz pela disponibilidade e ajuda na análise de todas as lâminas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adolfo Liao e ao Dr. Pedro Paulo Pereira, suplentes da banca de qualificação, pela amizade e pela disposição de tempo para ler a tese.

À Mara Hoshida e toda a equipe do LIM pela ajuda no armazenamento e análise dos materiais, pelas orientações nos passos laboratoriais e pelo auxílio na compra dos kits.

A todos os residentes que gentilmente ajudaram na coleta de dados das pacientes participantes deste estudo.

A todos os assistentes da clínica obstétrica, que sempre colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional desde os tempos da residência.

A todos os funcionários da clínica obstétrica pelo respeito e consideração todos os dias.

À estatística Agatha que colaborou para a análise dos resultados obtidos.

À Sra. Lucinda que ajudou no agendamento de reuniões e compromissos da tese, além da paciência na orientação para o cumprimento dos prazos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo fomento deste projeto de pesquisa (processo 481791/2011-6).

À minha sogra Rosa que muito nos ajudou a cuidar das nossas filhas para que pudesse escrever esta tese.

A todos os amigos e parentes que completam a minha vida.

À todas as gestantes que viveram um episódio de gravidez ectópica e que participaram deste estudo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras e Gráficos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	6
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3.1 Invasão Trofoblástica na Parede Tubária em Gestações Ectópicas.....	9
3.2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular.....	12
3.3 Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Gestação Ectópica.....	14
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	20
4.1 Casuística.....	21
4.2 Métodos.....	22
4.3 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	50
8 REFERÊNCIAS.....	52
9 APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β -hCG:	fração beta da gonadotrofina coriônica humana
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DP:	desvio padrão
<i>ELISA</i> :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO:	gene da eritropoietina
et al:	e outros
FIt-1:	fms-like tyrosine kinase-1
GE:	gestação ectópica
HCFMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG:	gonadotrofina coriônica humana
HE:	hematoxilina-eosina
HIF -1:	Fator induzido por hipóxia
hPL:	lactogênio placentário humano
ICHC:	Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
KDR:	Kinase Domain Receptor
LIM:	Laboratório de investigação médica
MMP:	metaloproteinases
MTX:	metotrexato

μm :	micrômetro
mUI/mL:	miliunidades internacionais por mililitro
PBS/Tween:	Phosphate buffered saline-Twen® Tablets
PIGF:	placental growth factor
Pg/mL:	picograma por mililitro
PMSP:	Prefeitura Municipal de São Paulo
RNA:	ácido ribonucleico
Rpm:	rotações por minuto
TIMP:	inibidores das metaloproteinases
TCLE:	Termo de consentimento livre e esclarecido
VEGF:	vascular endotelial growth factor
VPP:	Valor Preditivo Positivo
<:	menor que
>:	maior que
±:	mais ou menos
≤:	menor ou igual a

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Caracterização das gestantes quanto à idade materna e idade gestacional (n= 34) – HCFMUSP 2012 a 2013.....	36
Tabela 2-	Caracterização das gestantes quanto à cor, paridade, estado civil e antecedente de ectópica anterior (n= 34) – HCFMUSP 2012 a 2013.....	37
Tabela 3-	Idade gestacional e o grau de invasão do tecido trofoblástico – HCFMUSP – 2012 a 2013.....	40
Tabela 4-	VEGF tecidual e o grau de invasão do tecido trofoblástico – HCFMUSP – 2012 a 2013.....	41
Tabela 5-	Correlação entre o VEGF tecidual e o sérico – HCFMUSP – 2012 a 2013.....	41
Tabela 6-	Concentrações de VEGF tecidual na predição do grau de invasão trofoblástica – HCFMUSP – 2012 a 2013.....	42

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1-	Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica limitada à mucosa à microscopia óptica. Coloração HE e coloração Massom (aumento 100X).....	25
Figura 2-	Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica limitada à camada muscular à microscopia óptica. Coloração HE e hPL (aumento 100X)...	26
Figura 3-	Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica envolvendo toda a espessura da parede tubária à microscopia óptica. Coloração HE e coloração Masson (aumento 100X).....	27
Figura 4-	Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE após a realização da imuno-histoquímica e vista à microscopia com a análise do VEGF tecidual pela técnica do point-counting. (aumento 400X).....	31
Figura 5-	Fluxograma evidenciando a formação da população estudada.....	35
Gráfico 1-	Distribuição percentual das pacientes com GE de acordo com a classificação histológica da invasão trofoblástica na parede tubária – HCFMUSP 2012 a 2013.....	39

RESUMO

Teshima DRK. *Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): Concentrações séricas e teciduais em gestações ectópicas ampulares e a profundidade da invasão trofoblástica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Objetivo: Avaliar a correlação entre a concentração sérica e a expressão tecidual do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na interface materno embrionária e avaliar a associação entre a profundidade da invasão trofoblástica e a expressão tecidual do VEGF em gestações ectópicas ampulares. **Métodos:** Estudo prospectivo com 34 mulheres com o diagnóstico de gestação ectópica ampular espontaneamente concebidas, submetidas à salpingectomia no período de 11 de julho de 2012 a 19 de agosto de 2013. Os critérios de exclusão foram: diagnóstico de gestação tubária não ampular, impossibilidade de coleta de sangue para a dosagem do VEGF sérico, da análise anatomopatológica ou da dosagem do VEGF na peça cirúrgica. Após a confirmação diagnóstica de gestação tubária e antes da realização da salpingectomia foram dosadas as concentrações séricas maternas de VEGF pela técnica de luminex. Após o procedimento cirúrgico foi analisada a expressão tecidual de VEGF por imuno-histoquímica e pela técnica de point-counting. Histologicamente, a invasão trofoblástica na parede tubária foi classificada em grau I: limitada à mucosa da tuba uterina; grau II: até a camada muscular; grau III: invasão de toda a espessura da tuba uterina. **Resultados:** 8 pacientes apresentaram invasão grau I, 7 pacientes com grau II e 19 com invasão grau III. Não se observou diferença estatisticamente significativa na associação entre o VEGF tecidual e os diferentes graus de invasão trofoblástica ($p=0,621$) e a correlação do VEGF tecidual com a sua dosagem sérica pelo coeficiente de Spearman ($Rho = -0,057$) foi fraca ($p=0,748$). Foi realizado modelo de regressão logística para comparar o desempenho do VEGF tecidual como fator de predição da profundidade da invasão do trofoblasto na parede tubária, comparando o grau I vs II e III e o grau III vs I e II e não houve diferença estatisticamente significativa. **Conclusões:** em gestações ectópicas ampulares, a profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede tubária não está associada com a concentração tecidual do VEGF e não há correlação entre as suas dosagens sérica e tecidual.

Descritores: Gravidez ectópica; Gravidez tubária; Fatores de crescimento do endotélio vascular; Tubas uterinas; Estudos prospectivos

SUMMARY

Teshima DRK. *Vascular endothelial growth factor (VEGF): Serum and tissue concentration in ampullary pregnancies and the depth of trophoblastic invasion* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Objective: To evaluate the correlation between serum concentration and tissue expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) at the feto-maternal interface and to associate the depth of trophoblastic invasion into the tubal wall with tissue VEGF in ampullary pregnancies. **Methods:** A prospective study was conducted on 34 spontaneously conceived ampullary ectopic pregnancies that were submitted to salpingectomy between July 11th, 2012 and August 19th, 2013. Exclusion criteria were: diagnosis of not ampullary pregnancy, impossibility of collecting blood sample for serum VEGF determination, impossibility of either anatomopathological or tissue VEGF analysis. Maternal serum VEGF concentrations were measured after the diagnosis confirmation and before salpingectomy. After surgery, tissue VEGF expression was measured by immunohistochemistry and point counting technique. Histologically, trophoblastic invasion into the tubal wall was classified as grade I when limited to the tubal mucosa, grade II when reaching the muscle layer and grade III when comprising the full thickness of the tubal wall. **Results:** 8 patients had tubal infiltration grade I, 7 had grade II and 19 had grade III infiltration. Depth of trophoblastic invasion was not associated with tissue VEGF expression ($p = 0.621$). The correlation between tissue expression and serum VEGF concentration was not present (Spearman's coefficient, $Rho = -0.057$) ($p = 0.748$). Logistic regression showed that tissue VEGF expression was not predictor of trophoblastic invasion and there was not statistically significant difference when comparing grade I vs II and III and grade III vs I and II. **Conclusions:** in ampullary pregnancies, the depth of trophoblastic penetration into the tubal wall is not associated with tissue VEGF expression. Serum VEGF do not show any correlation with tissue expression.

Descriptors: Pregnancy, ectopic; pregnancy, tubal; Vascular endothelial growth factors; Fallopian tubes; Prospective studies.

1. INTRODUÇÃO

A gestação ectópica (GE) é definida como a implantação e o desenvolvimento do ovo fora da cavidade corporal do útero (Cunningham et al., 2014). Portanto, são consideradas GEs aquelas em que o tecido trofoblástico se implanta nas regiões intersticial e cervical do útero, na tuba uterina, na cavidade abdominal e nos ovários (Neme, 2006; Zugaib, 2012; Cabar, 2015a). Cerca de 95% estão localizadas na tuba uterina e 70% das GEs ocorrem na região ampular (Shaw et al., 2012).

A sua incidência é de 2% de todas as gestações (Khan et al., 2006; Shaw et al., 2010; Jurkovic et al., 2011) e é a maior causa de mortalidade materna no primeiro trimestre de gestação, responsável por até 9% das mortes neste período (Mueller et al., 2004; Varma e Gupta, 2009). No Reino Unido são diagnosticados cerca de onze mil casos por ano e a GE representa a quarta maior causa de morte materna (Lewis e Drife, 2004) com até 0,4 mortes por 1000 GEs (Lewis et al., 2007). No município de São Paulo, a GE foi responsável por 9,6% dos casos de mortalidade materna de causa obstétrica no biênio 2009 – 2010 e foi a segunda causa de morte materna no primeiro trimestre de gestação (Comitê Central de Mortalidade Materna – PMSP).

A incidência da GE aumentou nos últimos anos devido ao aumento dos fatores de risco, tais como as doenças sexualmente transmissíveis, principalmente a moléstia inflamatória pélvica; o aumento das cirurgias de laqueadura tubária e posterior tentativa de reversão; o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida; a realização de aborto induzido; a utilização da anticoncepção de emergência; a falha dos métodos anticoncepcionais e a primiparidade tardia (Pereira et al., 2005; Cabar et al., 2006; Cartwright et al., 2009; Pereira et al., 2011). Além disso, o desenvolvimento dos exames propedêuticos como a ultrassonografia transvaginal e a dosagem sérica da fração beta da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) possibilitaram o diagnóstico de casos de GE em regressão, que no passado não eram percebidos (Bouyer et al., 2003; Cabar et al., 2006; Cartwright et al., 2009).

Esse aprimoramento dos métodos propedêuticos causou uma diminuição na mortalidade materna, pois os casos de GE são diagnosticados mais precocemente (80% das vezes antes da ruptura). A morbidade e a mortalidade associadas às GEs são diretamente influenciadas pelo intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o tratamento. O diagnóstico precoce permite, também, o tratamento conservador e a tentativa de preservar o futuro reprodutivo dessas pacientes.

A tuba uterina é uma estrutura bilateral, com 10 a 12 cm de comprimento e que apresenta as seguintes divisões anatômicas: infundíbulo, ampola, istmo e porção intersticial. O infundíbulo é a porção mais distal da tuba e que contém as fimbrias na sua extremidade, responsáveis pela captação do óvulo. A região ampular é o segmento mais longo da tuba e onde, geralmente, ocorre a fecundação. O istmo se localiza medialmente à ampola e é o local mais estreito da tuba. Já a porção intersticial é o local onde a tuba se insere no útero (Gasser e Peppler, 1986). Cerca de 70% das GEs ocorrem na região ampular da tuba uterina (Bouyer et al., 2003; Shaw et al., 2012).

Do ponto de vista histológico, a tuba uterina é dividida em três camadas: serosa, muscular e mucosa. A camada serosa é a mais externa e é formada por fibroblastos, adipócitos, macrófagos e mastócitos, em meio a fibras elásticas e de colágeno. A camada muscular é composta por fibras musculares lisas dispostas longitudinalmente e em feixes circulares. Já a camada mucosa apresenta uma lâmina própria de tecido conectivo altamente vascularizado e com epitélio colunar simples constituído de células ciliadas, secretoras, indiferenciadas e células intercaladas (Peppler e Thompson, 1993).

Tubas acometidas por GE apresentam alterações funcionais como a redução da sua atividade ciliar ou até mesmo a destruição total das células e alterações morfológicas, como o desarranjo arquitetural da musculatura de sua parede secundária à reação inflamatória. (Vasquez et al., 1983; Green e Kott, 1989). Esta alteração morfológica da musculatura pode deixar o órgão hipoplásico, aumentando o risco de ocorrência de nova GE (Green e Kott,

1989; Montenegro et al., 2014). Portanto, acredita-se que o comprometimento da função da tuba depende do grau de invasão do trofoblasto em sua parede (Green e Kott, 1989).

Alguns fatores têm sido relacionados como possíveis preditores da invasão trofoblástica nas tubas de mulheres acometidas pela GE, tais como a dosagem sérica de β -hCG, a ultrassonografia transvaginal e mais recentemente, a dosagem sérica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estudos demonstram que a concentração sérica de β -hCG apresenta alta sensibilidade e especificidade na predição da invasão tubária pelo tecido trofoblástico e pode ser utilizada para a escolha do tipo de tratamento a ser realizado em pacientes acometidas pela GE. (Natale et al., 2003; Cabar et al., 2008; Cabar et al., 2010).

O VEGF é um importante fator angiogênico para a implantação do embrião e para a placentação. É uma glicoproteína ligada a heparina que modula o crescimento vascular, o remodelamento e a permeabilidade do endométrio, da decídua e do trofoblasto (Fasouliotis et al., 2004; Cabar et al., 2010). Ao contrário do hCG e da progesterona, que são trofoblasto dependentes, o VEGF é produzido tanto pelo trofoblasto, quanto pelo endométrio (Evans et al., 1998). A sua secreção é induzida por fatores de crescimento e citocinas e depende das condições locais como a hipóxia tecidual (Torry e Torry, 1997; Evans et al., 1998). Como o ambiente da implantação na tuba uterina é diferente do endométrio, que possui intensa vascularização, a produção e a secreção do VEGF sérico estão aumentadas em mulheres com GE, na tentativa de acomodação ao ambiente desfavorável (Shifren et al., 1996; Torry et al., 1996; Torry e Torry, 1996; Cabar et al., 2007).

O VEGF é encontrado nas células epiteliais, nas da musculatura lisa e nas dos vasos sanguíneos das tubas uterinas (Gordon et al., 1996; Lam et al., 2003a). Mulheres com o diagnóstico de hidrossalpinge, definida como o acúmulo anormal de líquido e a presença de dilatação tubária, apresentam maiores concentrações de VEGF (Lam et al., 2003b). Assim como o aumento dos níveis séricos de VEGF em resposta a situações de hipóxia, a

concentração e a secreção de receptores de VEGF nas células epiteliais da tuba uterina e nos fibroblastos estromais também estão aumentadas (Itoh H et al., 2006). Além disso, Lam et al. (2004) encontram maior concentração de VEGF na tuba uterina nos locais de implantação da GE em relação aos locais de não implantação, o que poderia favorecer a invasão e a fixação do trofoblasto na parede tubária.

Cabar et al. (2010) evidenciam uma relação direta do aumento do VEGF sérico e do grau de invasão trofoblástica na parede tubária. Em 30 pacientes estudadas com o diagnóstico de GE o nível sérico do VEGF de 297,2 pg/mL relaciona-se a invasão até a mucosa com 100% de sensibilidade e 90% de especificidade. Para a invasão completa da tuba, o valor de VEGF é de 440,1 pg/mL, com 81,8% de sensibilidade e 88,8% de especificidade. Os autores concluem que o nível sérico de VEGF se relaciona diretamente com o grau de invasão trofoblástica na parede tubária e pode auxiliar no tratamento das mulheres com GE.

Postula-se que uma maior produção de VEGF tecidual estaria relacionada a um aumento dos seus níveis séricos e possibilitaria uma maior invasão trofoblástica na parede tubária, com consequente maior risco de sangramento e de ruptura desta estrutura.

Até o presente momento, não existem estudos na literatura que relacionem o nível sérico e a expressão tecidual do VEGF e nem a profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede uterina com a expressão tecidual de VEGF. A análise desses mecanismos pode auxiliar na compreensão destas interações e possibilitar avanços no diagnóstico e no tratamento das GEs.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- Avaliar a correlação entre a concentração sérica e a expressão tecidual na interface materno embrionária do VEGF.
- Relacionar a profundidade de penetração do trofoblasto na porção ampular da parede tubária com a expressão tecidual do VEGF.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Invasão Trofoblástica na Parede Tubária em Gestações Ectópicas

Segundo Ferreira et al. (2014) existem dois fatores relacionados à invasão trofoblástica na parede tubária em mulheres com GE: primeiramente, a própria capacidade proliferativa das células (divisão e replicação) e, em segundo lugar, a ação angiogênica no sítio de implantação.

Randall et al. (1987) estudam a implantação e a placentação em 105 mulheres com GE e concluem que estes processos são semelhantes ao verificado nas gestações tópicas uterinas. O trofoblasto invade o espaço intersticial e os vasos sanguíneos e pode atingir a serosa tubária. Os autores afirmam, ainda, que a habilidade de implantação do blastocisto na tuba uterina indica que o processo de placentação depende exclusivamente do potencial de invasão do tecido trofoblástico e que os tecidos maternos desempenham papel passivo neste processo.

Do mesmo modo, Dietl et al. (1988), após revisão de 12 tubas de mulheres com GE, publicam estudo afirmando que o blastocisto penetra as lâminas próprias e muscular logo após a sua nidação. Tal mecanismo seria semelhante à invasão do trofoblasto no acretismo placentário, explicando a maior probabilidade de persistência do tecido trofoblástico após uma cirurgia conservadora.

Green e Kott (1989) analisam retrospectivamente 129 tubas acometidas por GE e encontram achados de salpingite crônica (88%) e salpingite ístima nodosa (43%). Além disso, eles também observam que a invasão trofoblástica na parede tubária ocorre em 46% dos casos e é possível encontrar vilos na parede e nos vasos sanguíneos das tubas, alertando para o fato de que uma simples aspiração do tecido ectópico de dentro da tuba uterina não é sempre curativa.

Natale et al. (2003) são os primeiros autores a sugerirem a classificação da invasão trofoblástica de acordo com o grau de profundidade na parede tubária em mulheres com GE. Considera-se grau I quando a invasão trofoblástica é limitada a mucosa, grau II até a camada muscular e

grau III quando atinge toda a espessura da tuba uterina, com ou sem rotura da serosa. Os autores estudam 37 pacientes com o diagnóstico de GE ampular submetidas à cirurgia de vídeo laparoscopia para salpingectomia e encontram 15 (40,5%) com grau I de invasão trofoblástica, 14 (37,8%) com grau II e 8 (21,6%) com grau III. Concluem que a profundidade da invasão trofoblástica não se relaciona com a idade gestacional e nem com o diâmetro da massa vista à ultrassonografia, porém tem forte correlação com os níveis séricos de hCG. Afirmam que níveis maiores que 6000 mUI/mL apresentam invasão até a camada muscular e justifica-se a realização de procedimentos mais radicais como a salpingectomia.

Cabar et al. (2006) estudam fatores preditivos para o grau de invasão trofoblástica na parede tubária em mulheres com GE, como a idade gestacional, a concentração de β -hCG e os achados da ultrassonografia. Um total de 105 pacientes com GE ampular é classificado, da mesma maneira que Natale et al. (2003), de acordo com o grau de invasão trofoblástica. A idade gestacional não se relaciona com o grau de invasão ($p=0,53$) e nem o tamanho da massa tubária vista à ultrassonografia ($p=0,43$). Apenas o β -hCG ($p<0,001$) e o tipo de imagem à ultrassonografia ($p=0,001$) se correlacionam com a profundidade da invasão. Níveis séricos de β -hCG de 2400 mUI/mL mostram 82,8% de sensibilidade e 85,5% de especificidade para o grau I e níveis de 5990 mUI/mL apresentam 82,6% de sensibilidade e 74,6% de especificidade para o grau III.

Pereira et al. (2009) também estudam a associação entre os achados da ultrassonografia transvaginal e a profundidade da invasão trofoblástica em mulheres com GE. Participam do estudo 85 mulheres submetidas à salpingectomia e que apresentam os achados de anel tubário ou embrião com atividade cardíaca pela ultrassonografia. Todas as pacientes com embrião vivo em tuba ($n=39$) apresentam grau de invasão trofoblástica II (17,9%) ou III (82,1%), enquanto as com anel tubário ($n=46$) se associam, na sua maioria, com o grau de invasão I (41,3%). Os autores concluem que os achados da ultrassonografia transvaginal podem indicar o grau de

invasão trofoblástica na parede tubária e a presença de embrião com atividade cardíaca se relaciona a uma maior profundidade de invasão e indica, conseqüentemente, maior probabilidade da necessidade de tratamento cirúrgico radical por meio da salpingectomia.

Do mesmo modo, Turgut et al. (2013) num estudo retrospectivo com 71 mulheres com GE ampular, encontram correlação positiva entre os níveis séricos de β -hCG e a profundidade da invasão trofoblástica ($p < 0,0001$). O valor de β -hCG que melhor prediz o grau de invasão III é 6475 mUI/mL com 100% de sensibilidade e 92% de especificidade. Em relação à idade gestacional, os autores encontram uma correlação positiva com aumento do risco de invasão da serosa tubária com o avançar da idade gestacional, porém não houve significância estatística quando comparados os graus de invasão trofoblástica I e II.

3.2. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

O VEGF é um potente fator angiogênico, responsável pela modulação do crescimento vascular, da remodelação e da permeabilidade do endométrio, decídua, trofoblasto e do desenvolvimento vascular do embrião (Carmeliet et al., 1996). Possíveis sítios de produção do VEGF incluem o corpo lúteo, endométrio e placenta (Evans et al., 1998; Ugurlu et al., 2009).

O VEGF estimula a angiogênese direta e indiretamente. Além de ser um potente mitógeno específico de células endoteliais (Ferrara et al., 1992; Mura et al., 2006), o VEGF aumenta a expressão de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, facilitando a penetração dos vasos nos tecidos e diminui a expressão endotelial dos inibidores das metaloproteinases (Hiratsuka et al., 2002; Qiu et al., 2011). Além disso, o VEGF possui efeito pró-inflamatório e neuroprotetor (Sakurai et al., 2003; Usui et al., 2004).

A família do VEGF consiste nos subgrupos VEGF-A (geralmente chamado de VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (placental growth factor – PIGF). Evidências sugerem que são potentes fatores de crescimento vascular e estão presentes na implantação normal e anormal do embrião (Andraweera et al., 2012). O subgrupo mais estudado é o VEGF-A, indispensável para o desenvolvimento do embrião e responsável pela angiogênese placentária, mudanças no estroma materno e remodelação das artérias espiraladas (Shao et al., 2013). O VEGF-B foi descoberto em 1995 e está relacionado com o miocárdio, músculo esquelético e pâncreas. Já o VEGF-C responde pela formação dos vasos linfáticos no coração, placenta, ovários, intestino delgado e tireoide. Os subtipos VEGF-D e VEGF-E ainda são pouco estudados (Nakagawa et al., 2000; Hoeben et al., 2004). O PIGF possui uma sequência de 42% aminoácidos idênticos ao do VEGF-A e tem função semelhante durante toda a gravidez intra-útero. Níveis séricos de PIGF são maiores nos últimos meses, se comparados aos estágios iniciais da gestação (Shao et al., 2013).

Existem sete isoformas conhecidas de VEGF-A em humanos: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ e desempenham funções diferentes no processo de angiogênese (Ferrara, 2004). As diferentes isoformas de VEGF se ligam a três receptores diferentes: VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1 ou Flt-1), VEGFR-2 (Kinase Domain Receptor ou KDR) e VEGFR-3. O VEGF-A se liga ao VEGFR-1 e VEGFR-2, enquanto o PlGF se liga apenas ao VEGFR-1 (Andraweera et al., 2012).

3.3. Fator de Crescimento Endotelial Vascular e Gestação Ectópica

3.3.1. Fator de Crescimento Endotelial Vascular Sérico

As condições de implantação do tecido trofoblástico na região tubária são diferentes da cavidade uterina, onde o endométrio é muito vascularizado e rico em oxigenação. Sabe-se que a expressão do VEGF está aumentada em situações de hipóxia. A hipóxia tecidual pode ser descrita como uma redução no nível normal de tensão de oxigênio nos tecidos e pode ser secundária a uma perfusão insuficiente (Hong et al., 2004). Em resposta às modificações de tensão de oxigênio, as células expressam genes específicos que sintetizam proteínas responsáveis por manter a homeostase tecidual. Um exemplo dessas proteínas é o HIF -1 (Fator induzido por hipóxia). O gene do HIF - 1 está localizado no cromossomo 14q21 e contém 15 éxons. Foi descoberto em 1988 através da identificação de um elemento de resposta à hipóxia presente no gene da eritropoietina (EPO), hormônio que controla a produção de eritrócitos e sofre transcrição induzida por hipóxia. Além de ser considerado um regulador da EPO, o HIF - 1 também é o responsável pela liberação do VEGF para estimular a angiogênese e provocar uma adaptação do metabolismo celular à condição de hipóxia (Semenza et al., 2011). Em condições de boa oxigenação tecidual, o HIF - 1 é degradado por uma enzima intracelular, enquanto que, em condições de hipóxia, essa enzima é inibida.

Em um estudo pioneiro, Daniel et al. (1999) observam que as concentrações séricas de VEGF estão mais elevadas em pacientes com GE quando comparadas às pacientes com gestações tópicas. Eles comparam, em um estudo prospectivo, 20 mulheres com o diagnóstico de GE, 10 com gestação tópica evolutiva e 10 com gestação tópica não-evolutiva. Os níveis séricos de VEGF estão aumentados no grupo das mulheres com GE, quando comparados a gestação tópica evolutiva e não-evolutiva. O estudo sugere que o nível sérico de VEGF > 200 pg/mL pode diferenciar gestações ectópicas das tópicas evolutivas com especificidade de 90% e valor preditivo

positivo (VPP) de 86% e gestações ectópicas das tópicas não-evolutivas com 80% de especificidade e VPP de 86%. Concluem que o VEGF sérico pode ser um marcador para facilitar o diagnóstico da GE e pode colaborar para a diminuição da morbidade e mortalidade materna.

Resultados semelhantes encontram Felemban et al. (2002) estudando 45 mulheres grávidas que foram divididas em GE, gravidez tópica evolutiva e gravidez tópica não-evolutiva (15 mulheres em cada grupo). O resultado do VEGF foi de $306,1 \pm 26,5$; $27,0 \pm 4,4$ e $169,7 \pm 16,6$ pg/mL, respectivamente. Com o nível sérico de VEGF de 200 pg/mL, podiam diferenciar as GEs das tópicas com sensibilidade de 88%, especificidade de 100% e um VPP de 100%. Entre as GEs e as tópicas não-evolutivas a sensibilidade é de 87,5%, especificidade de 75% e VPP de 77,8%. Os autores concluem que o VEGF é um marcador da GE e a sua concentração sérica está aumentada nessas mulheres quando comparadas à gestação tópica.

Daponte et al. (2005) realizam outro estudo com 48 pacientes divididas em um grupo com GE ($n = 27$) e outro com gestações tópicas não-evolutivas ($n = 21$). A idade gestacional média dos dois grupos era 7,15 e 7,3 semanas, respectivamente. O valor médio de VEGF do grupo com GE foi de 227,2 pg/ml e do outro grupo de 107,2 pg/mL ($p < 0,001$). Os autores sugerem que o aumento do VEGF sérico no grupo com GE deve-se à hipóxia tecidual da região tubária e concluem que esse marcador pode ser usado para um diagnóstico mais precoce, prevenindo assim a ruptura da tuba.

No Setor de Obstetrícia de Emergência da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, Cabar et al. (2007) também mostram um aumento do nível sérico de VEGF em mulheres com GE. Os autores estudam 60 gestantes com sangramento vaginal no primeiro trimestre. Essas mulheres foram divididas em três grupos: gestação tópica evolutiva, gestação tópica não-evolutiva e gestação ectópica tubária. A concentração sérica de VEGF foi significativamente maior no grupo de mulheres com GE quando comparadas às demais pacientes ($p < 0,001$). Concentrações séricas de VEGF $> 188,7$ pg/ml podiam diferenciar as GEs das tópicas com 96,7% de sensibilidade,

95% de especificidade, 90,6% de valor preditivo positivo e 98,3% de valor preditivo negativo.

Como a maioria dos casos de GE não possuem uma etiologia clara, Elito Júnior et al. (2010) formulam a hipótese de que a doença esteja relacionada a alterações genéticas. Os autores postulam que o polimorfismo dos genes -634C/G, -460T/C e +936C/T do VEGF estão relacionados a um maior risco de desenvolvimento de uma GE. Setenta e quatro pacientes com história de GE e 134 mulheres na pós-menopausa (grupo controle) participam do estudo. Não se observa diferença significativa em relação ao polimorfismo dos genes de VEGF: -460C/T ($p=0,70$), -634G/C ($p=0,17$) e +936C/T ($p=0,28$) no grupo das ectópicas. Além disso, o polimorfismo desses genes não está relacionado aos níveis séricos de VEGF: -460C/T ($p=0,34$), -634G/C ($p=0,70$) e +936C/T ($p=0,25$). Os autores concluem que não há relação entre o polimorfismo desses genes com a ocorrência da GE e nem com os níveis séricos de VEGF.

Estudo de Fernandes da Silva et al. (2013) compara 35 mulheres com GE, 15 com abortamento espontâneo e 22 com gravidez tópica evolutiva com a dosagem sérica de VEGF. A concentração sérica de VEGF é significativamente maior nas mulheres com GE (mediana de 211,1 pg/mL) quando comparadas ao grupo de gravidez evolutiva (mediana de 5 pg/mL) ($p<0,0001$). Já a comparação do VEGF sérico entre as mulheres com GE e o grupo de abortamento espontâneo não mostra diferença significativa (mediana 211,1 vs 231,9 pg/mL). A conclusão é que o VEGF sérico não distingue a GE de abortamentos, porém pode ser útil na diferenciação de uma gravidez tópica evolutiva de uma gravidez inviável (GE ou abortamento).

Alguns estudos mostram resultados divergentes dos anteriores, como Kucera-Sliutz et al. (2002) que estudam 84 mulheres com o diagnóstico de GE e gestação tópica não-evolutiva. A mediana do VEGF sérico no grupo das GE é de 211,1 (0 – 628,8) pg/mL e no grupo dos abortamentos é de 198,5 (0 – 701,6) pg/mL. Os autores concluem que valores séricos de VEGF > 200 pg/mL não discriminam os dois grupos em mulheres de até seis

semanas de gestação e, portanto, não podem ser utilizados para o diagnóstico da GE.

Outro estudo conduzido por Ugurlu et al. (2009) com 85 pacientes divididas em: 29 pacientes com GE, 29 com gravidez tópica normal e 28 com abortamentos espontâneos, também mostra resultados diferentes dos anteriores. Os autores encontram valores de VEGF 43,2 (0,86 – 101,2) pg/mL no grupo das pacientes com gravidez tópica normal, 26,2 (0,22 – 365,2) pg/mL nos abortamentos e 55,2 (0,20 – 179,2) pg/mL nas GE. Apesar da maior concentração sérica de VEGF nas GEs, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,27$). Portanto, os autores afirmam que o VEGF não diferencia as gestações tópicas das ectópicas.

3.3.2. Fator de Crescimento Endotelial Vascular Tecidual

Lam et al. (2004) evidenciam que os níveis teciduais de VEGF estão aumentados nos sítios de implantação da GE quando comparados aos sítios da tuba uterina onde não houve implantação do tecido trofoblástico. Dez mulheres submetidas à salpingectomia por vídeo laparoscopia são escolhidas para participarem do estudo. Os autores estudam a expressão do RNA mensageiro do VEGF e de seus receptores KDR e Flt-1 e observam que estão aumentados significativamente nos sítio de implantação da GE. O receptor KDR é também conhecido como VEGFR-2 e o Flt-1 como VEGFR-1. Os níveis de VEGF, KDR e Flt-1 nos sítios de implantação da GE em relação aos locais onde não houve implantação do tecido trofoblástico são, respectivamente, $4,92 \pm 0,59$ vs $3,06 \pm 0,55$ ($p<0,01$); $4,03 \pm 0,29$ vs $2,75 \pm 0,38$ ($p<0,01$) e $4,32 \pm 0,55$ vs $3,05 \pm 0,45$ ($p<0,01$). Portanto, devido ao aumento da concentração de VEGF e seus receptores na região de implantação tubária da GE, os autores concluem que o VEGF seria o principal responsável pela angiogênese e pela implantação da GE na tuba uterina.

Estudo de Zarezade et al. (2015) mostra resultados diferentes do anterior. Os autores investigam a expressão do RNA mensageiro de VEGF e de seus receptores KDR e Flt-1 nas tubas de dez mulheres com GE comparadas com dez mulheres que foram submetidas à histerectomia e apresentavam tubas normais. Essas últimas receberam uma injeção de hCG previamente à cirurgia para produzir um estado de pseudo-gravidez. As concentrações de VEGF e de seus receptores são menores em todos os segmentos das tubas de mulheres com GE, com exceção da região ampular que mostra uma maior expressão do receptor Flt-1. Esses resultados podem ser explicados pelo efeito do hCG na expressão do VEGF e de seus receptores, visto que as concentrações séricas dos hormônios sexuais podem aumentar a expressão do RNA mensageiro de VEGF em tubas normais (Lam et al., 2003a). A maior idade do grupo controle (média de 47,5 anos) também influencia os resultados, pois pode alterar os hormônios sexuais, citocinas e a expressão de fatores de crescimento. Os autores concluem que as expressões de VEGF e de seus receptores são menores em mulheres com GE quando comparadas com tubas normais de mulheres que receberam o hCG.

3.3.3. Fator de Crescimento Endotelial Vascular Sérico e o Grau de Invasão Trofoblástica

Estudo de Cabar et al. (2010) com 30 pacientes com o diagnóstico de GE relaciona o valor sérico do VEGF com o grau de invasão trofoblástica na parede tubária. O nível sérico do VEGF de 297,2 pg/mL relaciona-se a invasão até a mucosa com 100% de sensibilidade e 90% de especificidade. Para a invasão completa da tuba, o valor de VEGF é de 440,1 pg/mL, com 81,8% de sensibilidade e 88,8% de especificidade. Os autores concluem que o nível sérico de VEGF se relaciona diretamente com o grau de invasão trofoblástica na parede tubária e pode auxiliar no tratamento das mulheres com GE, principalmente para a preservação do futuro reprodutivo.

Outro estudo de Cabar et al. (2015b) mostra que mulheres com o achado de embrião com atividade cardíaca em tuba uterina visto a ultrassonografia se relaciona com maiores níveis de VEGF sérico. Cinquenta pacientes com o diagnóstico de GE são divididas em dois grupos: 22 com achado de embrião com atividade cardíaca em tuba e 28 com imagem de anel tubário. Nas mulheres com embrião com atividade cardíaca, o VEGF sérico encontrado é de 388,4 pg/mL, enquanto que no outro grupo o resultado é de 185,5 pg/mL. Os autores concluem que níveis séricos aumentados de VEGF relacionam-se com o achado de embrião com atividade cardíaca em tuba uterina e podem ser preditores de uma maior profundidade de invasão trofoblástica.

Ainda existem poucos estudos que relacionam o grau de profundidade da invasão trofoblástica da tuba uterina e os níveis séricos de VEGF em mulheres com GE. Por outro lado, não existem estudos com a análise do VEGF tecidual e sua comparação com o grau de invasão trofoblástica e nem com a dosagem do VEGF sérico. Tal fato, justifica a realização deste estudo que pode auxiliar na compreensão destas interações e possibilitar avanços no diagnóstico e no tratamento das GE.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Casuística

4.1.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídas neste estudo as pacientes que apresentaram:

- Realização de tratamento cirúrgico radical (salpingectomia);
- Gestação ectópica espontânea, isto é, sem a utilização de técnicas de reprodução assistida;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídas desse estudo as pacientes que apresentaram:

- Diagnóstico intraoperatório de gestação tubária não ampular;
- Ausência de coleta de sangue para a dosagem sérica de VEGF no dia da cirurgia;
- Impossibilidade de análise da amostra de sangue;
- Impossibilidade de análise anatomopatológica do produto de salpingectomia;
- Impossibilidade de dosagem tecidual do VEGF na peça cirúrgica.

4.2. Métodos

Realizou-se estudo prospectivo e transversal envolvendo pacientes com o diagnóstico de gestação tubária em região ampular, que foram atendidas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de 11 de julho de 2012 a 19 de agosto de 2013.

O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice E) foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob o número 51757/12 e pela Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP (Apêndice A).

Foi obtido fomento pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) para este projeto de pesquisa (processo 481791/2011-6) (Apêndice D).

4.2.1. Coleta de Dados

Após a confirmação do diagnóstico de GE, as pacientes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidadas para participar do estudo. Foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido e assinado por todas as pacientes.

As pacientes atendidas no Setor de Obstetrícia de Emergência da Clínica Obstétrica do HCFMUSP com quadro clínico sugestivo de GE foram submetidas ao algoritmo preconizado para diagnóstico de GE (Apêndice B). Após confirmação do diagnóstico de GE, as pacientes foram encaminhadas para tratamento conservador (clínico ou cirúrgico) ou radical, conforme seu estado hemodinâmico, desejo de preservação do potencial reprodutivo, concentração e evolução da β -hCG sérica, quantidade de líquido livre na pelve e tamanho da massa ectópica avaliados pela ultrassonografia, seguindo o protocolo estabelecido pelo Setor de Emergência da Clínica

Obstétrica do HCFMUSP (Pereira, 2011).

Os dados referentes ao atendimento de pacientes incluídas no presente estudo foram armazenados em um instrumento de coleta de dados para posterior análise (Apêndice C). Constam informações como identificação, antecedentes pessoais e obstétricos (paridade, tipo de partos prévios, história prévia de abortamento ou GE), uso de método contraceptivo, hábitos e exame físico no momento da internação, bem como resultados de exames complementares (β -hCG, ultrassonografia, VEGF sérico, etc.), tipo de tratamento realizado, localização da GE (diagnóstico cirúrgico) e evolução clínica da paciente. Estes dados foram preenchidos no momento da alta hospitalar e posteriormente confirmados durante seu retorno ambulatorial.

No dia da cirurgia, amostras de sangue foram colhidas por punção venosa periférica. Foram coletados 10 ml de sangue de cada paciente para determinação da concentração de VEGF. Posteriormente, o material foi enviado e armazenado no Laboratório de Análises Especiais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 03).

Após a realização da cirurgia de salpingectomia, as tubas foram encaminhadas em solução de formalina a 10% para o laboratório de anatomia patológica da HCFMUSP para classificação anatomopatológica de cada caso e posteriormente para o laboratório central do ICHC (Instituto Central do Hospital das Clínicas) para avaliação e quantificação do VEGF tecidual.

Todos os dados foram tabulados em uma planilha de Excel e encaminhados para a análise estatística.

4.2.2. Classificação Histopatológica da Profundidade da Invasão Trofoblástica na Tuba Uterina

As pacientes incluídas no estudo foram submetidas à cirurgia de salpingectomia e as tubas uterinas foram enviadas para posterior análise histopatológica.

O exame anatomopatológico de todos os casos consistiu em análise macroscópica minuciosa com determinação da área comprometida, área de dilatação máxima e medidas da tuba uterina. As tubas uterinas foram fixadas em formalina a 10% e seccionadas de maneira seriada para análise por microscopia óptica.

Foram analisados, em média, dez cortes de cada tuba corada com hematoxilina-eosina. Para facilitar a identificação do tecido invadido pelo trofoblasto, o material histológico foi também corado pela técnica de Masson a fim de que fossem identificadas as fibras musculares das tubas uterinas. Coloração imuno-histoquímica para lactogênio placentário humano (hPL) foi realizada para possibilitar a identificação de trofoblasto intermediário e determinar a profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina.

A análise histológica foi realizada por uma única e experiente médica patologista que, no momento do exame, não tinha informações acerca das condições clínicas, cirúrgicas e laboratoriais das pacientes. A médica patologista classificou histologicamente a profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina, adotando o seguinte critério (Natale et al., 2003):

- Grau I: infiltração trofoblástica limitada à mucosa da tuba uterina (Figura 1);

Figura 1: imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica limitada à mucosa à microscopia óptica. Coloração HE e coloração Massom (aumento 100X)

- Grau II: infiltração trofoblástica até a camada muscular da tuba uterina (Figura 2);

Figura 2: Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica limitada à camada muscular à microscopia óptica. Coloração HE e hPL (aumento 100X)

- Grau III: infiltração trofoblástica envolvendo toda a espessura da tuba uterina (Figura 3).

Figura 3: Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE com invasão trofoblástica envolvendo toda a espessura da parede tubária à microscopia óptica. Coloração HE e coloração Masson (aumento 100X)

4.2.3. Dosagem Sérica do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Luminex

O sangue das pacientes foi coletado no dia da cirurgia por meio de punção venosa periférica, em tubo seco com gel separador, e posteriormente encaminhado ao LIM 03 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para processamento. Após coagulação da amostra por 30 minutos, o soro foi separado do sangue total por meio de centrifugação a 4500 rpm por 20 minutos a 4°C, separado em duas alíquotas e armazenado em freezer a -70°C para posterior análise.

As análises das amostras foram realizadas em duplicata utilizando-se kit da Bio-plex Pro TM Human Cytokine 27-plex Assay, conforme orientação do fabricante.

Os ensaios foram realizados por equipe alheia à condição clínica de cada gestante. As reações para dosagem de VEGF foram feitas com diluição de 1:2, de maneira que os resultados das medições estivessem dentro da faixa mensurável das curvas-padrão do kit.

Resumidamente, o teste de citocina com o Bio-plex é realizado para quantificar múltiplas citocinas ao mesmo tempo no plasma. O luminex possui princípio similar ao ELISA sanduíche. As microesferas coloridas e fluorescentes, também chamadas de *beads*, são revestidas com anticorpos monoclonais contra os oito alvos analisados e foram adicionadas aos poços. Amostras e padrões (variando de 0,1 a 10.000 pg/mL para cada análise) foram pipetados nos poços e incubados. Os poços foram lavados e aspirados com lavadora magnética na qual as microesferas ficaram retidas na placa pela ação de um ímã (Bio-plex PRO II Wash Station). Após lavagem, uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada e incubada novamente. A estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada e incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços (mínimo de 100 por análise) uma solução

tampão (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem registradas no analisador de microesferas (Bio-plex 200). As concentrações das amostras desconhecidas (antígenos nas amostras de plasma) foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL.

4.2.4. Dosagem Tecidual do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Imuno-histoquímica

Para a análise da expressão tecidual de VEGF foram realizadas reações de imuno-histoquímica em cortes histológicos de fragmentos de tuba uterina de gestantes dos grupos estudados pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase.

Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram obtidos, colhidos em lâminas de vidro previamente tratadas com solução adesiva de Organo-Silano a 2% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EUA). As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina para análise morfológica.

A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol a 60°C, por 30 minutos, seguido por dois banhos de xilol a temperatura ambiente por 30 minutos e hidratados em uma série de concentrações decrescentes de etanol, água corrente e água destilada. Após serem lavadas em tampão Tris-salina (TBS 20 mM), pH 7,4 as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo:

1. Resgate dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) por imersão das lâminas em citrato (pH 6,0) por 1 minuto a 125°C. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e em PBS/Tween (Phosphate buffered saline-Twen® Tablets).

2. Incubação com os anticorpos primários de VEGF (Lab Vision Corporation cód.:222P405A, Fremont, CA). A diluição utilizada para todos os anticorpos foi de 1:800, realizada em solução diluente e aplicado sobre os cortes do tecido. As lâminas foram incubadas “overnight”.

3. As lâminas foram, então, lavadas em PBS/Tween e incubadas em estufa a 37°C com anticorpo secundário Novolink Polymer (Leica Biosystems Newcastle Ltd).

4. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS/Tween e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Corporation cód. D5637, St Louis, Missouri, EUA). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e em água destilada e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente e em água destilada, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

5. A avaliação da imunomarcagem do VEGF no tecido tubário foi realizada por método estereológico do *point-counting* baseado em Gundersen et al. (1988), com modificações, utilizando um sistema de análise de imagens (*Image-Pro Plus 6.0*). Resumidamente, este sistema é constituído por uma câmara fotográfica (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada) acoplada a um microscópio (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan), que captura as imagens e as envia para o monitor, por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada). Utilizando os recursos de medidas do software foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos sobre a imagem capturada de forma ortogonal. A avaliação foi realizada por um observador, às cegas, em 10 campos randomizados do tecido da tuba uterina, em aumento de 400X. A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para o VEGF foi expressa conforme a fórmula: $P = (P_i \times 100) / P_t$; sendo P_i , o número de pontos que incide sobre a marcação positiva por imuno-histoquímica e P_t , o número total de pontos analisados. A porcentagem (P)

do VEGF foi calculada a partir da soma dos resultados de todos os campos analisados para cada amostra.

Figura 4: Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE após a realização da imuno-histoquímica e vista à microscopia com a análise do VEGF tecidual pela técnica do point-counting. (aumento 400X)

4.3. Análise Estatística

4.3.1. Cálculo do Tamanho da Amostra

Em modelos de regressão, para cada variável explicativa são necessários de sete a quinze casos do desfecho estudado (Hair, 2005). Neste estudo, a variável de desfecho apresenta três categorias (Grau de invasão trofoblástica I, II e III) e o tamanho amostral deve-se levar em conta a frequência de cada uma. Conforme estudo de Cabar et al. (2006), a invasão do tecido trofoblástico na parede das tubas uterinas em mulheres com GE pode obedecer a seguinte proporção: 27% com grau I, 28% com grau II e 45% com grau III.

De acordo com essas informações e considerando quinze casos para cada variável explicativa (VEGF sérico e tecidual) e, conjuntamente, obtendo-se no mínimo 25% em cada categoria de desfecho (grau I, II e III), são necessários sete pacientes em cada grupo.

4.3.2. Constituição dos Grupos

Os casos foram divididos em três grupos de acordo com a classificação histológica:

- Grau I: infiltração trofoblástica limitada à mucosa da tuba uterina.
- Grau II: infiltração trofoblástica até a camada muscular da tuba uterina.
- Grau III: infiltração trofoblástica envolvendo toda a espessura da tuba uterina.

4.3.3. Variáveis Analisadas

Os grupos foram comparados quanto a:

- Concentração sérica materna de VEGF
- Concentração tecidual de VEGF

4.3.4. Análise Estatística

Para a análise estatística foram usados os softwares Microsoft Excel versão 2007 para construção do banco de dados e IBM SPSS Statistics for Macintosh 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) para cálculos estatísticos.

Os dados qualitativos foram descritos pela utilização de frequência absoluta e relativa (percentual) e foram comparados por meio do teste exato de Fisher.

Para o resumo de variáveis quantitativas, foram utilizadas as medidas mediana, mínimo, máximo, média e desvio-padrão (DP).

Com o intuito de correlacionar as medidas de VEGF sérico e tecidual, foi considerado o coeficiente de correlação de Spearman.

A diferença entre os grupos de invasão trofoblástica em relação ao VEGF tecidual foi verificada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Foi utilizado o modelo de regressão logística para comparar conjuntamente o desempenho da variável de interesse (concentração de VEGF tecidual) com relação ao grau de invasão trofoblástica na parede da tuba uterina (Armitage et al., 2001; Hosmer Jr e Lemeshow, 2013).

O nível de significância adotado foi de 5%.

4.3.5. Caracterização da População

No período do estudo foram atendidas no Setor de Obstetrícia de Emergência do HCFMUSP 63 mulheres com o diagnóstico de GE. Destas, 42 foram selecionadas para participar do estudo, pois atendiam aos critérios de inclusão propostos.

Das vinte e uma pacientes que não foram selecionadas para participar do estudo, quinze foram tratadas clinicamente de forma expectante, sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Cinco receberam metotrexato e uma não foi possível a obtenção do termo de consentimento.

Das 42 pacientes incluídas no estudo, oito foram excluídas posteriormente, pois em três não foi possível identificar o sítio de implantação tubária, duas não apresentaram tecido trofoblástico no exame anatomopatológico, uma não foi possível a identificação do VEGF tecidual e não foi coletado o sangue para a dosagem do VEGF sérico em 2 pacientes (Figura 5).

Figura 5: Fluxograma evidenciando a formação da população estudada

A idade das pacientes e a idade gestacional estão demonstradas na Tabela 1. Em relação à distribuição racial, 24 mulheres eram brancas (70,6%) e as outras 10 (29,4%), não brancas. Quanto à paridade, 17 mulheres eram nulíparas (52,9%) e em cinco casos (14,7%) havia o antecedente de GE na tuba uterina contralateral (Tabela 2).

Tabela 1 - Caracterização das gestantes quanto à idade materna e idade gestacional (n= 34) – HCFMUSP 2012 a 2013

Característica	Resultados	
	Média (DP)	Mediana (mínimo – máximo)
Idade materna, anos	29,8 (6,6)	30,5 (19 – 40)
Idade Gestacional, semanas	7,6 (2,7)	7,5 (4 – 13,6)

DP: desvio-padrão

Tabela 2 - Caracterização das gestantes quanto à cor, paridade, estado civil, e antecedente de ectópica anterior (n= 34) – HCFMUSP 2012 a 2013

Características	Resultados n (%)
Cor, n (%)	
Branca	24 (70,6)
Não Branca	10 (29,4)
Paridade, n (%)	
0	18 (52,9)
1	7 (20,6)
2	6 (17,6)
3 ou +	3 (8,8)
Estado civil, n (%)	
Amasiada	6 (17,6)
Casada	6 (17,6)
Solteira	22 (64,7)
Antecedente de ectópica, n (%)	5 (14,7)

n: número

5. RESULTADOS

Na avaliação histológica, oito pacientes apresentaram invasão trofoblástica grau I (23,53%), sete com grau II (20,59%) e 19 (55,88%) com grau III (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição percentual das pacientes com GE de acordo com a classificação histológica da invasão trofoblástica na parede tubária – HCFMUSP 2012 a 2013

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos histológicos quanto à idade gestacional, como pode ser observado pela Tabela 3 ($p=0,604$).

Tabela 3 - Idade gestacional e o grau de invasão do tecido trofoblástico – HCFMUSP – 2012 a 2013

Grau de invasão trofoblástica	Número de pacientes	Idade gestacional (semanas) MEDIANA (mín - máx)
I	8	6,00 (4,00 – 13,28)
II	7	7,71 (4,00 – 13,57)
III	19	7,71 (4,00 – 12,28)

p= 0,604 (Testes não-paramétrico de Kruskal-Wallis)

Os títulos séricos de VEGF variaram de 0,36 a 205,16 pg/mL, com mediana de 14,77 pg/mL.

A mediana da porcentagem encontrada de VEGF tecidual foi de 16,07, com variação de 3,44 a 50,14. A porcentagem de VEGF tecidual não atingiu diferença estatisticamente significativa entre os graus de invasão trofoblástica (p= 0,621) (Tabela 4).

Tabela 4 – VEGF tecidual e o grau de invasão do tecido trofoblástico – HCFMUSP – 2012 a 2013

Grau de invasão trofoblástica	Número de pacientes	VEGF (% por campo) Mediana (Min - Max)	VEGF (% por campo) Média (DP)
I	8	20,44 (4,23 – 36,50)	20,77 (10,87)
II	7	16,08 (7,22 – 50,14)	19,68 (14,08)
III	19	15,14 (3,44 – 29,26)	16,52 (7,61)

p= 0,621 (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis)

A dosagem sérica do VEGF não mostrou correlação estatisticamente significativa quando comparado à sua expressão tecidual. O coeficiente de Spearman ($Rho = - 0,057$) mostrou uma correlação fraca entre as duas variáveis (p= 0,748) (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre o VEGF tecidual e o sérico – HCFMUSP – 2012 a 2013

Coeficiente de correlação de Spearman
(Rho)

VEGF sérico

VEGF tecidual

- 0,057

p= 0,748

Foi realizado modelo de regressão logística, incluindo a variável explicativa (concentrações de VEGF tecidual) com o objetivo de comparar o seu desempenho como fator de predição da profundidade da invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina. Foi ajustado um modelo de regressão logística comparando o grau I vs graus II e III e outro modelo considerando como resposta o grau III vs graus I e II. Observou-se que, para a predição de ambos os graus de invasão trofoblástica, o VEGF tecidual não apresentou diferença estatística (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentrações de VEGF tecidual na predição do grau de invasão trofoblástica – HCFMUSP – 2012 a 2013

Grau de invasão trofoblástica	Fator	Coeficiente (estimativa)	Erro padrão	p*
Grau I	VEGF tecidual	0,410	0,410	0,321
Grau III	VEGF tecidual	- 0,045	0,039	0,230

* análise regressão logística ($p < 0,05$)

6. DISCUSSÃO

O aprimoramento dos métodos propedêuticos, incluindo o avanço da tecnologia ecográfica e dos recursos laboratoriais, causou uma maior rapidez no diagnóstico da GE. Desta maneira, houve uma diminuição da mortalidade e a possibilidade de realizar um tratamento conservador com a preservação do futuro reprodutivo dessas pacientes.

No passado, o objetivo do tratamento da GE era retirar todo o tecido trofoblástico implantado na região tubária para preservar a vida da paciente. Atualmente, em função deste desenvolvimento dos exames subsidiários, tornou-se possível realizar tratamentos mais conservadores, tanto clínicos quanto cirúrgicos.

Estudos mostram que o tratamento clínico da GE, seja pela conduta expectante ou pela utilização do metotrexato (MTX), permite a preservação da permeabilidade tubária após a resolução completa do quadro. Os primeiros autores a utilizarem o MTX são Tanaka et al. (1982) no tratamento de mulheres com GE intersticial e mostram a manutenção da permeabilidade tubária bilateral vista à histerossalpingografia após o tratamento medicamentoso.

Posteriormente, outros estudos com o MTX intramuscular, dose única ou múltiplas doses, mostram uma permeabilidade tubária entre 52% e 88% nas pacientes com GE tratadas de forma conservadora (Debby et al., 2000; Olofsson et al., 2001; Guvendag et al., 2010). Além disso, outros estudos mostram segurança e eficácia semelhante ao tratamento cirúrgico ao utilizar o MTX nas GE, principalmente com níveis de β -hCG abaixo de 3000 mUI/mL (Mol et al., 2008; Kirk et al., 2011).

Entretanto, somente a manutenção da permeabilidade tubária não garante a preservação da sua função, visto que tubas acometidas por GE apresentam alterações funcionais como a redução da atividade ciliar ou até mesmo a destruição total das células e alterações morfológicas, como o desarranjo arquitetural da musculatura de sua parede secundária à reação inflamatória. (Vasquez et al., 1983; Green e Kott, 1989). Portanto, acredita-se que o comprometimento da função da tuba depende do grau de invasão

do trofoblasto em sua parede (Green e Kott, 1989). As tubas preservadas após um episódio de GE devem permitir o encontro dos gametas e auxiliar o transporte do embrião até a cavidade uterina. Caso isso não ocorra, a manutenção da tuba apenas aumenta o risco de uma nova GE (Yao e Tulandi, 1997; Tay et al., 2000).

Portanto, a pesquisa de marcadores que possam permitir o diagnóstico precoce e a seleção dos casos em que a profundidade da lesão tubária seja menor, a ponto de não comprometer a sua função, é de grande interesse assistencial.

Optou-se pela investigação do tecido trofoblástico implantado na região ampular da tuba uterina por representarem mais de 70% das GE tubárias (Shaw et al., 2012). Na população estudada, 23,5% das pacientes apresentaram invasão trofoblástica até a mucosa da tuba uterina, 20,6% tiveram invasão até a camada muscular e os demais 55,9% apresentaram invasão por toda a espessura da parede tubária. Esta distribuição percentual é semelhante ao estudo realizado por Cabar et al. (2006) com 27,6% das pacientes com invasão até a mucosa, 28,6% até a camada muscular e 43,8% por toda a espessura da parede tubária. A presença de maior número de casos com invasão do trofoblasto atingindo pelo menos a camada muscular (76,5%) é concordante com a maioria dos trabalhos publicados na literatura (Budowick et al., 1980; Randall et al., 1987; Dietl et al., 1988; Green e Kott, 1989; Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006). A principal explicação para esse achado é ainda a dificuldade do diagnóstico precoce da gravidez ectópica em alguns casos e a característica assistencial terciária do Setor de Obstetrícia de Emergência da Clínica Obstétrica do HCFMUSP que atende pacientes com maior complexidade e que são encaminhadas de outros serviços.

O tempo de gestação é diretamente proporcional ao período de exposição da tuba uterina ao fenômeno de invasão trofoblástica, portanto seria esperada uma maior profundidade de invasão em pacientes com uma idade gestacional mais avançada. Porém, neste estudo, a profundidade da invasão trofoblástica na região tubária não se relacionou com a idade

gestacional na data do diagnóstico da GE (Tabela 2), confirmando os achados de Natale et al. (2003) e Cabar et al. (2006). Portanto, a idade gestacional não foi critério de inclusão no presente estudo.

Uma explicação para este fato é que na GE, a idade gestacional é aferida somente a partir da data da última menstruação, visto que não é possível a sua confirmação pela ultrassonografia como na gravidez tópica, podendo assim apresentar erro na sua datação. Porém, apesar da dificuldade na precisão do cálculo da idade gestacional de algumas mulheres, principalmente devido à irregularidade menstrual e ao esquecimento da data da última menstruação, pode-se afirmar que o tempo de atraso menstrual não reflete, necessariamente, o potencial de invasão do trofoblasto na tuba uterina.

A análise dos dados obtidos apresentou uma grande variação nos valores de VEGF sérico e tecidual, por isso optou-se pela interpretação de suas medianas em detrimento às suas médias.

A mediana das concentrações séricas de VEGF de acordo com o grau de invasão trofoblástica foi: grau I com 69,88 pg/mL (5,30 – 93,46), grau II com 14,53 pg/mL (0,36 – 68,16) e grau III com 9,08 (0,50 – 205,16). Houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar os graus de invasão I e III pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,031$). Porém, os valores séricos de VEGF foram maiores nos graus de invasão trofoblástica mais superficiais. Esses dados foram contrários aos encontrados por Cabar et al. (2010) que mostram uma relação direta entre o aumento da dosagem sérica de VEGF e a profundidade da invasão trofoblástica na tuba uterina. Outro estudo de Cabar et al. (2015b) também mostra resultados diferentes, onde o achado de embrião com atividade cardíaca em tuba uterina se relaciona com maiores concentrações séricas de VEGF e maior grau de invasão trofoblástica.

Optou-se pela inclusão desses dados referentes à concentração sérica de VEGF e o grau de invasão trofoblástica no item discussão, ao invés de nos resultados, pois esta análise não fazia parte dos objetivos deste estudo.

Sabe-se que a concentração de VEGF sérico está aumentada em condições de hipóxia como na região tubária. Nesses casos, além do aumento dos níveis de VEGF, observa-se também um aumento da concentração de seu receptor Flt-1 como demonstram Vuorela et al. (2000). Evans et al. (1998) observam que os níveis de VEGF e de seu receptor estão aumentados quando as células de coriocarcinoma são cultivadas em ambiente com baixa oxigenação. Portanto, apesar do aumento do VEGF sérico com a hipóxia no sítio de implantação tubária, seu receptor flt-1 possivelmente também está aumentado, o que pode contribuir para a diminuição da sua fração livre no sangue.

Além disso, segundo Evans et al. (1998) os níveis séricos de progesterona e β -hCG aumentam nos primeiros estágios da gravidez e possuem importante relação com o aumento do VEGF, colaborando para a invasão trofoblástica. Os autores afirmam que a progesterona aumenta a produção de VEGF em células epiteliais da retina e o hCG aumenta o VEGF nas células da granulosa. Como os níveis séricos de progesterona e hCG estão diminuídos na GE, apesar da hipóxia local, a produção de VEGF pode permanecer inalterada devido ao efeito negativo da diminuição daqueles hormônios.

Estudos anteriores mostram que o estrogênio aumenta a secreção de VEGF em humanos e animais (Cullivan et al., 1993; Bausero et al., 2000). Da mesma maneira, com a diminuição dos níveis séricos de Estrogênio, Progesterona, gonadotrofina coriônica humana (hCG), além de possivelmente outras citocinas e fatores de crescimento ainda desconhecidos na GE, o VEGF pode apresentar aumento de sua concentração, porém sem significância estatística devido a esse contrabalanceamento.

Buscou-se a associação entre a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária e a expressão tecidual materna de VEGF. A partir do estudo de Lam et al. (2004) que mostra maiores concentrações de VEGF nos sítios de implantação da GE e segundo Cabar et al. (2010) que mostram

que o VEGF sérico está aumentado nos casos de maior invasão trofoblástica, a hipótese inicial era de que, quanto maior a expressão tecidual, maior o nível sérico de VEGF e mais profunda seria a invasão das células trofoblásticas na parede da tuba uterina. Essa predição do grau de invasão tubária poderia trazer melhor compreensão a respeito dos fatores que favorecem a invasão trofoblástica na tuba uterina.

Entretanto, a porcentagem de VEGF tecidual foi semelhante nos três graus de invasão trofoblástica ($p = 0,621$) e não mostrou diferença estatisticamente significativa. Esse achado sugere que o VEGF no local da implantação tubária em mulheres com GE parece não estar relacionado à invasão trofoblástica. Postula-se que outras citocinas e outros fatores de crescimento ainda desconhecidos possam colaborar para esse processo. Além disso, a presença de metaloproteinasas (MMP), que são um grupo de endopeptidases responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e da membrana basal (Qiu et al., 2011), pode estar relacionada com a profundidade da invasão trofoblástica. A atividade das MMP é controlada por inibidores específicos conhecidos como inibidores teciduais de MMP (TIMP). As TIMP são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam ambas as funções das MMP, o nível de sua ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato. O equilíbrio entre a produção de MMP e a de TIMP representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular.

A partir deste achado, fomos investigar se a expressão tecidual de VEGF se relacionava com a sua concentração sérica. Intuitivamente, pode-se imaginar que quanto maior a expressão tecidual, maior a sua concentração sérica. Porém, após análise do coeficiente de Spearman ($Rho = -0,057$), observou-se uma correlação fraca entre essas duas variáveis ($p = 0,748$), de forma que a concentração tecidual do VEGF não refletiu a sua concentração sérica. Portanto, acredita-se que o VEGF sérico esteja relacionado à invasão trofoblástica na tuba uterina, porém sem relação com a expressão tecidual deste marcador.

Por meio deste estudo, procurou-se compreender a razão pelo qual o tecido trofoblástico encontra melhores condições de invasão em alguns casos, atingindo as camadas mais profundas da tuba uterina. O entendimento desse processo e a sua relação com os possíveis preditores da invasão trofoblástica nas tubas uterinas, como a dosagem sérica de β -hCG e a ultrassonografia, podem auxiliar no diagnóstico e tratamento das mulheres com GE.

Portanto, o VEGF no sítio de implantação da GE pode não ser o principal responsável pelas modificações locais propícias para o desenvolvimento do trofoblasto. Outros estudos são necessários para a identificação do exato mecanismo de interação celular local que permite, em alguns casos, que ocorra maior invasão do trofoblasto na parede tubária.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- I. A concentração sérica de VEGF não se relaciona com a sua expressão tecidual na interface materno embrionária.
- II. A profundidade de penetração do trofoblasto na porção ampular da parede tubária não se associa com a expressão tecidual do VEGF.

8. REFERÊNCIAS

-
- Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update*. 2012; 18:436-57.
 - Armitage PB. Regression and Correlation. In: Armitage PB, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. 4th ed. Oxford: Blackwell; 2001.
 - Bausero P, Ben-Mahdi M, Mazucatelli J, Bloy C, Perrot-Applanat M. Vascular endothelial growth factor modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am J Physiol*. 2000;27:2033–42.
 - Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly JL, Fernandez H, Gerbaud L, Job-Spira N. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol*. 2003; 157:185-94.
 - Budowick M, Johnson TR Jr, Genadry R, Parmley TH, Woodruff JD. The histopathology of the developing tubal ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1980; 34:169-71.
 - Cabar FR, Pereira PP, Schultz R, Zugaib M. Predictive factors of trophoblastic invasion into the ampullary region of the tubal wall in ectopic pregnancy. *Hum Reprod*. 2006; 21:2426-31.
 - Cabar FR, Pereira PP, Zugaib M. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sérico como marcador de gestação tubária. *Anais do XII Congresso de Obstetrícia e Ginecologia da SOGESP*. 2007.
 - Cabar FR, Feedback PB, Pereira PP, Zugaib M. Serum markers in tubal pregnancy diagnosis. *Clinics*. 2008; 63:701-8.

-
- Cabar FR, Pereira PP, Schultz R, Francisco RP, Zugaib M. Vascular endothelial growth factor and β -human chorionic gonadotropin are associated with trophoblastic invasion into the tubal wall in ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2010; 94:1595-600.
 - Cabar FR. Síndromes hemorrágicas da 1^a. metade da gestação. In: Cabar FR. *Obstetrícia 2 – principais temas para provas de residência médica*. São Paulo: MEDCEL; 2015a;p 41-54.
 - Cabar FR, Pereira PP, Schultz R, Francisco RP, Zugaib M. Association between ultrasound findings and serum levels of vascular endothelial growth factor in ampullary pregnancy. *Fertil Steril*. 2015b; 103:734-7.
 - Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollfeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380:435-9.
 - Cartwright J, Duncan WC, Critchley HOD, Horn AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reproduction*. 2009;138:9-22.
 - Comitê Central de Mortalidade Materna – Prefeitura Municipal de São Paulo. Relatório de Mortalidade Materna no Município de São Paulo durante o biênio 2009/2010 [Internet]. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/mulher/RelMortMaterna0910.pdf>
 - Cullivan Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen induced increases in uterine

capillary permeability and growth. *Endocrinology*. 1993;133:829–32.

- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Dashe JS, Hoffman BL, Casey BM, Sheffield JS. Ectopic pregnancy. In: Cunningham G, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap LC, Wenstrom KD (editors). *Williams Obstetrics*. 24 ed. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2014; p. 253-72.
- Daniel Y, Geva E, Lerner-Geva L, Eshed-Englender T, Gamzu R, Lessing JB, Bar-Am A, Amit A. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with ectopic pregnancy: is this a novel marker? *Fertil Steril*. 1999; 72:1013-7.
- Daponte A, Pournaras S, Zintzaras E, Kallitsaris A, Lialios G, Maniatis AN, Messinis IE. The value of a single combined measurement of VEGF, glycodelin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Human Reprod*. 2005; 20:3163-6.
- Debby A, Golan A, Sadan O, Zakut H, Glezerman M. Fertility outcome following combined methotrexate treatment of unruptured extrauterine pregnancy. *BJOG*. 2000; 107:626-30.
- Dietl J, Buchholz F, Kindler PA. Histopathology of tubal pregnancy. *Int J Gynecol Obstet*. 1988; 27:385-8.
- Elito Júnior J., Daher S, Fernandes da Silva MO, Marconi NM, Pendeloski KP, Moron AF, Camano L. Association study of vascular endothelial growth factor and polymorphisms of its gene with ectopic pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 63:120-5.

-
- Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmond C. A longitudinal study of maternal serum VEGF in early pregnancy. *Hum Reprod.* 1998; 13:1057-62.
 - Fasouliotis SJ, Spandorfer SD, Witkin SS, Liu HC, Roberts JE, Rosenwaks Z. Maternal serum vascular endothelial growth factor levels in early ectopic and intrauterine pregnancies after in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril.* 2004; 82:309-13.
 - Felemban A, Sammour A, Tulandi T. Serum vascular endothelial growth factor as a possible marker for early ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2002; 17:490-2.
 - Fernandes da Silva MO, Elito Júnior J, Daher S, Camano L, Fernandes Moron A. Association of serum levels of vascular endothelial growth factor and early ectopic pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2013; 40:489-91.
 - Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992; 13:18-32.
 - Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25:581-611.
 - Ferreira DF, Elito Júnior J, Araujo Junior E, Stavale JN, Camano L, Moron AF. Trophoblastic infiltration in tubal pregnancy evaluated by immunohistochemistry and correlation with variation of beta-human chorionic gonadotropin. *Patholog Res Int.* 2014; 2014:302634.

-
- Gasser RF, Peppler RD. Anatomy, histology and embryology of the fallopian tubes. In: Langer A, Iffy L, editors. Extrauterine pregnancy. Littleton: PSG Publishing; 1986.
 - Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB: Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:353-9.
 - Green LK, Kott ML. Histopathologic findings in ectopic tubal pregnancy. *Int J Gynecol Pathol.* 1989; 8:255-62.
 - Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988, 96:857-881.
 - Guvendag Guven ES, Dilbaz S, Dilbaz B, Aykan Yildirim B, Akdag D, Haberal A. Comparison of single and multiple dose methotrexate therapy for unruptured tubal ectopic pregnancy: a prospective randomized study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010; 89:889-95.
 - Hair Jr. JF, Black B, Babin B, Anderson RE, Tatham RL. Multivariate data analysis. 6th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2005; 928 p.
 - Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002; 2:289-300.

-
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosteron ATV, Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56:549-80.
 - Hong, SS.; Lee, H.; Kim, KW. HIF-1 alpha: a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat* 2004; 36:343-53.
 - Hosmer Jr. DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression, Textbook and Solutions Manual.* 3rd ed. Nova Iorque: Wiley Publishers; 2013.
 - Itoh H, Nasu K, Matsumoto H, Kawano Y, Yoshimatsu J, Narahara H: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 secretion by human oviductal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Fertil Steril.* 2006; 85(Suppl 1):1097-102.
 - Jurkovic D, Wilkinson H. Diagnosis and management of ectopic pregnancy. *BMJ.* 2011; 342:d3397.
 - Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006; 367:1066–74.
 - Kirk E, Van Calster B, Condous G, Papageorgiou AT, Gevaert O, Van Huffel S, De Moor B, Timmerman D, Bourne T. Ectopic pregnancy: using the hCG ratio to select women for expectant or medical management. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011; 90:264-72.
 - Kucera-Sliutz E, Schiebel I, König F, Leodolter S, Sliutz G, Koelbl H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and discrimination between abnormal intrauterine and ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2002; 17:3231-4.

-
- Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Lok IH, Yuen PM, Cheung LP, Haines C: Vascular endothelial growth factor in the human oviduct: localization and regulation of Messenger RNA expression in vivo. *Biol Reprod.* 2003a; 68:1870-6.
 - Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Po LS, Cheung LP, Haines C: Increased mRNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (flt-1) in the hydrosalpinx. *Hum Reprod.* 2003b; 18:2264-9.
 - Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Leung SW, Cheung LP, Haines C: Increased Messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the implantation site of the human oviduct with ectopic gestation. *Fertil Steril.* 2004; 82:686-90.
 - Lewis G, Drife J (editors). "Why Mothers Die", Triennial Report 2000-2002. In: The Sixth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. RCOG Press; (November) 2004.
 - Lewis G (editors). "Saving Mother's Lives: Reviewing maternal deaths to make motherhood safer – 2003-2005. In: The Seventh Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. RCOG Press; (December) 2007.
 - Mol F, Mol BW, Ankum WM, van der Veen F, Hajenius PJ. Current evidence on surgery, systemic methotrexate and expectant management in the treatment of ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Human Reprod Update.* 2008; 14:309-19.
 - Montenegro CAB, Rezende Filho J. I: Montenegro CAB, Rezende Filho J. (editors). *Obstetrícia fundamental*. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014; p. 291-304.

-
- Mueller MD, Raio L, Spoerri S, Ghezzi F, Dreher E, Bersinger NA. Novel placental and nonplacental serum markers in ectopic versus normal intrauterine pregnancy. *Fertil Steril*. 2004; 81:1106-11.
 - Mura M, Han B, Andrade CF, Seth R, Hwang D, Waddell TK, Keshavjee S., Liu M. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. *Crit Care*. 2006;10:130.
 - Nakagawa K, Chen YX, Ishibashi H, Yonemitsu Y, Murata T, Hata Y, Nakashima Y, Sueishi K. Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26:61-6.
 - Natale A, Candiani M, Merlo D, Izzo S, Gruft L, Busacca M. Human chorionic gonadotropin level as a predictor of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ectopic pregnancy: a blinded study. *Fertil Steril*. 2003; 79:981-6.
 - Neme B, Pereira PP, Zugaib M. *Prenhez ectópica*. In: Neme B. *Obstetrícia Básica*. 3a ed. São Paulo: Sarvier. 2006; p. 372-94.
 - Olofsson JI, Poromaa IS, Ottander U, Kjellberg L, Damber MG. Clinical and pregnancy outcome following ectopic pregnancy; a prospective study comparing expectancy, surgery and systemic methotrexate treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001; 80:744-9.
 - Peppler RD, Thompson CC. Anatomy, embryology and physiology of the fallopian tube. In: Stovall TG, Ling FW (editors). *Extrauterine*

pregnancy: clinical diagnosis and management. Nova Iorque: McGraw-Hill; 1993;p. 9-26.

- Pereira PP, Cabar FR, Raiza LC, Roncaglia MT, Zugaib M. Emergency contraception and ectopic pregnancy: report of 2 cases. Clinics. 2005; 60: 497-500.
- Pereira PP, Cabar FR, Schultz R, Zugaib M. Association between ultrasound findings and extent of trophoblastic invasion into the tubal wall in ampullary pregnancy. Ultrassound Obstet Gynecol . 2009; 33:472-6.
- Pereira PP. Gravidez ectópica. In: Zugaib M, Bittar RE. Protocolos assistenciais da Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da USP. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2011; p.421-6.
- Qiu X, Xie Y, Chen L, Gemzell-Danielsson K. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the feto-maternal interface in unruptured ectopic tubal pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011; 90:966-71.
- Randall S, Buckley CH, Fox H. Placentation in the fallopian tube. Int J Gynecol Pathol. 1987; 6:132-9.
- Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:3578-85.
- Semenza, G. L. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. N Engl J Med. 2011; 365:537-47.

-
- Shao R, Hu J, Feng Y, Billig H. Aberrant alteration of vascular endothelial growth factor-family signaling in human tubal ectopic pregnancy: what is known and unknown? *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6:810-5.
 - Shaw JL, Dey SK, Critchley HO, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2010; 16:432-44
 - Shaw JL, Diamandis EP, Horne AW, Barnhart K, Bourne T, Messinis IE. Ectopic pregnancy. *Clin Chem*. 2012;58:1278–85.
 - Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:3112-8.
 - Tanaka T, Hayashi H, Kutsuzawa T, Fujimoto S, Ichinoe K. Treatment of interstitial ectopic pregnancy with methotrexate: report of a successful case. *Fertil Steril*. 1982; 37:851-5.
 - Tay JL, Moore J, Walker JJ. Ectopic pregnancy. *BMJ*. 2000; 320:916-9.
 - Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endometrial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril*. 1996; 66:72-80.

- Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *AM J Reprod Immunol.* 1997; 37:21-9.
- Turgut EN, Celik E, Celik S, Arikan DC, Altuntas H, Leblebici C, Purisa S, Dnasuk R. Could serum β -hCG levels and gestational age be the indicative factors for the prediction of the degree of trophoblastic invasion into tubal wall in unruptured ampullary pregnancies? *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 287:323-8.
- Ugurlu EN, Ozaksit G, Karaer A, Zulfikaroglu E, Atalay A, Ugur M. The value of vascular endothelial growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, and progesterone for early differentiation of ectopic pregnancies, normal intrauterine pregnancies, and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril.* 2009; 91:1657-61.
- Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Kaji Y, Poulaki V, Moore J, Moore T, Amano S, Horikawa Y, Dartt D, Golding M, Shima DT, Adamis AP. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:368-74.
- Varma R, Gupta J. Tubal ectopic pregnancy. *BMJ Clin Evid.* 2009; Pii:1406.
- Vasquez G, Winston RM, Brosens IA. Tubal mucosa and ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1983; 90:468-74.
- Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000;95:353-7.

-
- Yao M, Tulandi T. Current status of surgical and nonsurgical management of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1997; 67:421-33.
 - Zarezade N, Darabi SS, Ramezanali F, Amirchaghmaghi E, Khalili G, Moini A, Aflatoonian R. mRNA expression of VEGF and its receptors in fallopian tubes of womens with ectopic pregnancies. *Int J Fertil Steril*. 2015;9:55-64.
 - Zugaib M. Gravidez ectópica. In: Zugaib M (ed). *Obstetrícia*. Barueri: Manole; 2012; p. 549-65.

APÊNDICES

Apêndice A

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E TECIDUAIS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF), EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS INIBIDORES NA INTERFACE MATERNO-FETAL EM GESTAÇÕES ECTÓPICAS AMPULARES

Pesquisador Responsável: FÁBIO ROBERTO CABAR

Versão: 1

Pesquisador Executante: DÉCIO ROBERTO KAMIO TESHIMA **CAAE:** 01707712.1.0000.0068

Co-autores: Pedro Paulo Pereira, Regina Schultz, Rossana P. O. Francisco, Marcelo Zugaib

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 51757

Data da Relatoria: 04/07/2012

Apresentação do Projeto: O projeto de pesquisa é adequadamente apresentado, justificado e embasado nos dados da literatura.

Objetivo da Pesquisa: A pesquisa proposta tem por objetivo avaliar fatores séricos e teciduais envolvidos na angiogênese nas gestações tubárias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos para as paciente são mínimos (venoclise com coleta de sangue para a dosagem sérica do fator de crescimento endotelial e vascular). O estudo não proporciona benefício individual para as pacientes do estudo, mas proporcionará possível embasamento para manejo terapêutico na eventualidade de gestações ectópicas (tubárias).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é bem planejada, com critérios de inclusão e exclusão bem determinados. É factível e envolve metodologia já estabelecida na Instituição de Ensino e Pesquisa onde será realizada. Há declaração de concordância na colaboração dos Departamentos envolvidos na mesma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE é claro e de fácil entendimento pelas pacientes que representarão a casuística do trabalho de pesquisa.

Recomendações: Sugiro à Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição a aprovação do projeto de pesquisa em questão.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sugiro a Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição a aprovação do projeto de pesquisa em questão.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 11 de Julho de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

São Paulo, 17 de novembro de 2.011

À
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPESQ

Prezados Senhores,

Informamos que o Projeto intitulado "Concentrações Séricas e Teciduais do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Expressão de Metaloproteinases e seus Inibidores na Interface Materno-fetal em Gestações Ectópicas Ampulares", sob a coordenação do Dr. Fábio Roberto Cabar, foi aceito para ser desenvolvido em conjunto com a Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Informamos também que a patologista Dra. Regina Schultz ficará responsável pelas tarefas a serem desenvolvidas nesta Divisão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves
Diretor
Divisão de Anatomia Patológica

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – PAMB - 10º andar – Anatomia Patológica - CEP 05403-000
tels.: 3069-6091 / 6092 / 6281 / 7996 – fax: 3069-7997 – e-mail.: fatur.dap@hcnet.usp.br

Apêndice B

ALGORITMO PARA DIAGNÓSTICO DE GRAVIDEZ ECTÓPICA

Diagnóstico de gravidez ectópica. GE = gravidez ectópica; SG = saco gestacional

Apêndice C

SETOR DE OBSTETRÍCIA DE EMERGÊNCIA

CLÍNICA OBSTÉTRICA – HCFMUSP

Gestação ectópica

Nome: _____ idade: _____

Cor: _____

Est. Civil: _____ escolaridade: _____

profissão: _____

End: _____ cidade: _____

tel: _____

RGHC: _____ Data: ____/____/____ alta: ____/____/____

HPMA:

Antecedentes: Menarca: ____ anos 1ª. Relação: ____ anos

No. Parceiros: _____

DST: sim não corrimento: sim não

Fumante: sim (no. Cigarros/dia: _____) não

GE prévia: sim não lado: direito esquerdo ambos

Cirurgia pélvica prévia: sim

(_____) não

Endometriose: sim não

Anticoncepção: sim (Método: _____ tempo: ____ anos) não

Gestação: ____ paridade: ____ Abortos: ____ CTG: sim não

Gravidez atual

DUM: ____/____/____ IG: ____

Fertilização assistida: sim (Método: _____) não

Indução da ovulação: sim (Método: _____) não

Falha de anticoncepção: sim (Método: _____) não

PA: ____/____ **Pulso:** ____ **Temp:** ____ **Hb:** ____ **Ht:** ____

Progesterona: _____ **beta-hCG:** _____

Dor: cólica pontada peso queimação lancinante

Lado: direito esquerdo generalizada

Escapulalgia: sim não sangramento vaginal: sim (leve moderado acentuado) não

Colo uterino: amolecido (sim não)

Fundo de saco posterior: doloroso (sim não) abaulado (sim não)

USG abdominal: imagem: ausente, embrião com BCF, embrião sem BCF, saco gestacional com vesícula vitelínica, anel tubário, imagem complexa, líquido livre ausente, líquido livre restrito ao FSP, líquido livre envolvendo útero até anexos, líquido livre em goteira parieto-cólica ou espaço de Morrison.

USG vaginal: imagem: ausente, embrião com BCF, embrião sem BCF, saco gestacional com vesícula vitelínica, anel tubário, imagem complexa.

Tamanho da imagem: ____x____x____cm

GE: íntegra rota

Conduta

Cirurgia dia: ____/____/____ cm – Laparoscopia Laparotomia

Salpingectomia, salpingostomia, ressecção parcial da tuba

Lado da GE: (direito, esquerdo, ambos)

Local: (ampola, ístmico, fimbria, interstício, ovário, colo, abdômen)

Expectante, MTX (local, sistêmico), outras:

Complicações: transfusão, deiscência, abscesso, septicemia, UTI, óbito.

Apêndices

Data				
Hb				
Ht				
Leuco				
Plaquetas				
Progesterona				
β-hCG				
VEGF sérico				

Apêndice D

Prestação de Contas - Relatório Técnico Final

Identificação

Processo : 481791/2011-6
Chamada Pública : Universal 14/2011 - Faixa A - até R\$20.000,00
Coordenador do Projeto : Fabio Roberto Cabar
CPF : 214.488.868-05

Projeto

Título :

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E TECIDUAIS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF), EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS INIBIDORES NA INTERFACE MATERNO-FETAL EM GESTAÇÕES ECTÓPICAS

Resumo :

Em virtude de sua elevada incidência, morbidade e mortalidade o estudo da gestação ectópica (GE) representa um importante tema dentro da Obstetria moderna. Principalmente em países desenvolvidos, essa intercorrência obstétrica é encarada como verdadeiro problema de Saúde Pública. Nos Estados Unidos, o número de pacientes com GE aumentou de 17800 / ano no início da década de 70 para mais de 108000 casos / ano no início dos anos 90, com sua prevalência chegando a 2% de todas as gestações (Marchbanks et al., 1988; Centers for Disease Control and Prevention, 1995). No Reino Unido são diagnosticados cerca de 11000 casos por ano (incidência de 11,5 por 1000 gestações) e a GE representa a quarta causa de morte materna (Crowhurst & Plaat, 1999; Lewis and Drife, 2004). Na parede tubária (Green & Kott, 1989).

Alguns pesquisadores defendem que a invasão profunda de tecido trofoblástico na parede tubária é evento comum (Budowick et al., 1980; Dietl et al., 1988); o blastocisto penetraria a lâmina própria e a camada muscular do órgão, atingindo até subserosa. Outros autores observaram o crescimento exclusivo desse tecido para a luz da tuba uterina (Senterman et al., 1988; Stock, 1991). A implantação do embrião e a placentação são processos fundamentais para o estabelecimento da viabilidade da gestação. Estes processos são caracterizados por extensiva angiogênese, situação na qual um potente agente angiogênico, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), desempenha um papel de destaque (Senger et al., 1983; Leung et al., 1989; Neufeld et al., 1999). Essa substância age como principal fator parácrino e autócrino, modulando o crescimento, a remodelação e a permeabilidade vascular no endométrio, decídua e trofoblasto (Torry and Torry, 1997; Torry, et al., 1996; Shifren et al., 1996; Clark et al., 1996). É também indispensável durante o desenvolvimento vascular do embrião (Carmeliet et al., 1996). Existem alguns critérios que são apontados como preditores da profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina; a definição de fatores preditivos de lesão morfológica e funcional da tuba uterina acometida por gestação ectópica poderia colaborar na escolha do tratamento para pacientes com desejo reprodutivo. Dessa forma, seria possível evitar a retirada de estruturas pouco comprometidas e melhorar o prognóstico reprodutivo. Maiores concentrações de β -hCG estão relacionadas com invasão trofoblástica mais profunda (Cabar et al., 2006; Cabar et al., 2010; Qiu et al., 2011); Pereira et al. (2009) estudaram a relação entre imagem ultrassonográfica e invasão trofoblástica e mostraram que a presença de embrião com batimento cardíaco à ultrassonografia está relacionada com invasão mais profunda do tecido trofoblástico na parede tubária. Da mesma forma, também ficou demonstrado que maiores concentrações séricas de VEGF estão relacionadas com maior profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede tubária (Cabar et al., 2010). A hipótese é que quanto maior a produção de VEGF e, consequentemente, maior a angiogênese tecidual e maior a possibilidade de ser encontrada invasão profunda do trofoblasto na parede tubária.

Recentemente, foi descrito que a expressão de metaloproteinases (MMP) nos sítios de implantação tubária também estava relacionada com a profundidade de invasão trofoblástica. Nestes locais, a expressão dos inibidores das metaloproteinases (TIMP) era menor do que o normalmente verificado. Sugeriu-se que o desbalanço entre a expressão destas substâncias levaria a maior destruição da matriz extracelular. Não são completamente conhecidas as alterações bioquímicas e interações celulares que permitem ao maior ou menor desenvolvimento do tecido ectópico implantado nas tubas uterinas. Do mesmo modo, nenhum estudo mostrou a relação entre as concentrações séricas e a expressão tecidual do VEGF em gestações tubárias: não se sabe, exatamente, em que proporção a produção de VEGF ocorre nas células do epitélio tubário ou do tecido trofoblástico. O estudo destes mecanismos poderia auxiliar na compreensão destas interações e possibilitar avanços no diagnóstico e terapêutica das gestações tubárias.

Apêndice E

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE.....SEXO () M () F
DATA DE NASCIMENTO/...../.....
ENDEREÇO.....
CEP..... TEL (.....).....
CIDADE.....ESTADO.....
RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, etc).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE.....SEXO () M () F
DATA DE NASCIMENTO...../...../.....
ENDEREÇO.....
CEP..... TEL (.....).....
CIDADE.....ESTADO.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E
TECIDUAIS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) NA
INTERFACE MATERNO-FETAL EM GESTAÇÕES ECTÓPICAS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Fábio Roberto Cabar
CARGO/FUNÇÃO: Médico
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL no. 97391

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dr. Décio Roberto Kamio Teshima
CARGO/FUNÇÃO: Médico
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL no. 104301

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Obstétrica – ICHC - Disciplina de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(X) RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar as concentrações no sangue e na trompa do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e das metaloproteinases na trompa de mulheres com gravidez ectópica e com a indicação de tratamento cirúrgico.

O tratamento proposto não será alterado em nada se você concordar em participar da pesquisa: 10 ml de sangue colhidos por punção periférica da veia do antebraço no dia da cirurgia e a trompa doente serão encaminhados para análise no laboratório.

O risco do procedimento de punção da veia do antebraço é a formação de um pequeno hematoma no local.

Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese da correlação dos níveis do VEGF no sangue e na trompa de mulheres com gravidez ectópica, não apresentando qualquer benefício direto para a participante do estudo.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são o Dr. Fábio Roberto Cabar e o Dr. Décio Roberto Kamio Teshima, que podem ser encontrados no endereço: Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 10º andar e no tel 3069-6209. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Desta forma, são garantidos a você:

- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

- Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores
- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

4. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E TECIDUAIS DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) NA INTERFACE MATERNO-FETAL EM GESTAÇÕES ECTÓPICAS”

Eu discuti com o Dr. Decio Roberto Kamio Teshima sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Apêndices

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____