URSULA TROVATO GOMEZ

Avaliação da expressão das metaloproteinases e de seus inibidores no sítio de implantação trofoblástica em gestações ectópicas ampulares

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gomez, Ursula Trovato
Avaliação da expressão das metaloproteinases e de seus inibidores no sítio de implantação trofoblástica em gestações ectópicas ampulares / Ursula Trovato Gomez. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Maria de Lourdes Brizot.

Descritores: 1.Gravidez ectópica 2.Metaloproteinases 3.Metaloproteinases da matriz 4.Inibidores de metaloproteinases de matriz 5.Inibidores teciduais das metaloproteinases

USP/FM/DBD-355/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, digníssimo professor titular do Departamento de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de fazer parte desta Clínica.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, pela compreensão e apoio de sempre e pela valiosa colaboração na qualificação.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot, que fez possível a concretização deste trabalho, pela orientação essencial, broncas necessárias e paciência infinita.

Ao Dr. Pedro Paulo Pereira, pelo apoio incondicional na realização desta dissertação, pelos ensinamentos, confiança e amizade e preocupação verdadeiras.

Ao Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho e ao Dr. Fábio Roberto Cabar, pela participação e colaboração na qualificação.

À Mara Hoshida, Ana Cristina Alves e a toda a equipe do LIM-57 e à Ângela Batista Gomes dos Santos, Esmeralda Miristeni Ehner e Sandra de Morais Fernezlian, do Laboratório de Imunologia, pela disponibilidade e pelo suporte técnico essencial.

Aos colegas da Patologia Dr. Marcello Pecoraro Toscano e Dra. Amanda Saraiva e ao colega obstetra Dr. Tiago José de Oliveira, pela disponibilidade e trabalho de marcação inicial das lâminas.

Às estatísticas Agatha Sacramento Rodrigues e Elizabeth Gonzalez Patiño, por me ensinarem e explicarem a análise dos resultados.

Aos assistentes e ex-assistentes da Clínica Obstétrica, responsáveis pela minha formação profissional desde a época da graduação.

Aos funcionários da Clínica Obstétrica, pela consideração e convivência diárias.

Ao Dr. Wagner Rodrigues Hernandez, pela parceria profissional, ensinamentos, amizade e suporte em todos os momentos.

Aos meus tios Puri e José Otávio, que me possibilitaram as horas de tranquilidade necessárias para continuar e finalizar este trabalho.

Aos meus avôs Juán e Maria, pelo exemplo de determinação e superação.

Ao meu pai Cláudio, pelo trabalho de uma vida, que me permitiu chegar até aqui; pela coragem, que me dá forças para ir mais longe.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

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. 3a 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 gráficos
Lista de figuras
RESUMO
ABSTRACT
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 8
3 REVISÃO DA LITERATURA 10
3.1 Invasão trofoblástica na parede tubária em gestações ectópicas 11
3.2 Metaloproteinases e seus inibidores 17
3.3 Metaloproteinases e seus inibidores e gestação ectópica 25
4 MATERIAIS E MÉTODOS 30
4.1 Cálculo do tamanho da amostra 31
4.2 Casuística 32
4.2.1 Critérios de inclusão 32
4.2.2 Critérios de exclusão 32
4.3 Coleta de dados 33
4.3.1 Formação da população 33
4.3.2 Classificação histopatológica da profundidade da invasão trofoblástica na tuba uterina 35
4.3.3 Avaliação da expressão tecidual das metaloproteinases e seus inibidores no sítio de implantação trofoblástica 39
4.3.4 Constituição dos grupos 45
4.4 Variáveis analisadas 45
4.5 Análise dos dados 46
5 RESULTADOS 47
5.1 Caracterização da população 48
5.2 Análise qualitativa 50
5.3 Análise quantitativa 59

6 DISCUSSÃO 66
6.1 Achados principais 67
6.2 Interpretação dos resultados em relação a estudos publicados 69
6.3 Pontos fortes e limitações 71
6.4 Aplicações clínicas e de pesquisa 73
7 CONCLUSÃO 77
8 ANEXOS 79
9 REFERÊNCIAS 82
10 APÊNDICE 102

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

βhCG:	Fração beta da gonadotrofina coriônica humana
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DIP:	Doença inflamatória pélvica
DP:	Desvio-padrão
ELISA:	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
et al.:	e outros
GE:	Gestação ectópica
HCFMUSP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG:	Gonadotrofina coriônica humana
HE:	Hematoxilina-eosina
ICHC:	Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IHQ:	Imuno-histoquímica
kDa:	Quilodálton
LIM:	Laboratório de Investigação Médica
MEC:	Matriz extracelular
MMP:	*Matrix metalloproteinase,* metaloproteinases
MTX:	Metotrexato
μm:	Micrômetro

mUI/mL:	Miliunidades internacionais por mililitro
OR:	*Odds ratio*
PCR:	*Polymerase Chain Reaction*
pg/mL:	Picograma por mililitro
RNA:	*Ribonucleic Acid,* Ácido ribonucleico
RT-PCR:	*Reverse Polymerase Chain Reaction*
SEM:	*Scanning Electron Microscopy*
TIMP:	*Tissue inhibitor of metalloproteinase,* inibidores das metaloproteinases
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEV:	Trofoblasto extraviloso
USGTV:	Ultrassonografia transvaginal
VEGF:	*Vascular Endotelial Growth Factor,* Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VPP:	Valor preditivo positivo
VPN:	Valor preditivo negativo
<:	Menor que
>:	Maior que
±:	Mais ou menos
≤:	Menor ou igual a
≥:	Maior ou igual a

TABELAS

Tabela 1 – Características da população (n= 34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....49

Tabela 2 – Expressões qualitativas da MMP-2, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=33) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 52

Tabela 3 – Expressões qualitativas da MMP-9, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=31) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 53

Tabela 4 – Expressões qualitativas da MMP-14, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=32) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 54

Tabela 5 – Expressões qualitativas do TIMP-1, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 55

Tabela 6 – Expressões qualitativas do TIMP-2, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=32) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 56

Tabela 7 – Expressões qualitativas do TIMP-3, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 57

Tabela 8 – Porcentagens das expressões moderada (++) ou forte (+++) de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares, na população geral do estudo e nas subpopulações selecionadas – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....58

Tabelas 9 – Porcentagens das expressões quantitativas de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares, em relação aos graus de invasão trofoblástica – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 61

Tabela 10 – Comparação entre as porcentagens de expressões quantitativas da MMP-2 e os graus de invasão trofoblástica, agrupados dois a dois, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....62

Tabela 11 – Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-2 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....63

Tabela 12 – Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-9 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....64

Tabela 13 – Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-14 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013.....65

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagens das expressões qualitativas (0: ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: forte) de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 50

Gráfico 2 - Distribuição das porcentagens das expressões quantitativas de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da formação da população estudada.....34

Figura 2 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, com invasão trofoblástica limitada à mucosa, à microscopia óptica. Coloração HE – aumento 50X 38

Figura 3 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, com invasão trofoblástica limitada à camada muscular, à microscopia óptica. Coloração HE **–** aumento 50X 38

Figura 4 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, envolvendo toda a espessura da parede tubária, à microscopia óptica. Coloração HE **–** aumento 100X 39

Figura 5 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão fraca da MMP-14, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x.....43

Figura 6 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão moderada do TIMP-2, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x 44

Figura 7 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão forte da MMP-2, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x.....44

RESUMO

Gomez UT. *Avaliação da expressão das metaloproteinases e de seus inibidores no sítio de implantação trofoblástica em gestações ectópicas ampulares* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

OBJETIVOS: O presente estudo objetiva investigar as expressões qualitativa e quantitativa das metaloproteinases (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs), no sítio de implantação do trofoblasto, nas gestações ectópicas ampulares, além de correlacioná-las com o grau de invasão tubária. **MÉTODOS:** estudo prospectivo incluindo 34 pacientes com diagnóstico de gestação tubária ampular, que foram submetidas à salpingectomia, entre 2012 e 2013. Foi realizada avaliação histológica da profundidade da invasão trofoblástica das tubas obtidas. Em seguida, foram avaliadas, por meio de imuno-histoquímica indireta, as expressões dos marcadores MMP-2, MMP-9 e MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3, de forma qualitativa e quantitativa. Por fim, correlacionou-se o grau de invasão trofoblástica com a expressão de cada marcador e com as razões metaloproteinase/inibidor possíveis. **RESULTADOS:** tanto na avaliação qualitativa, quanto na quantitativa, a MMP-2 (11,23%; 3,58 – 19,52) foi o marcador com maior expressão nos sítios de implantação, enquanto a MMP-9 (2,23%; 0,19 – 5,39) e o TIMP-3 (2,53%; 0,13 – 15,27) estiveram apenas fracamente expressos. Houve ampla variação entre as expressões dos marcadores e das razões metaloproteinase/inibidor estudadas, quando comparadas aos graus de invasão. **CONCLUSÃO:** há expressão das metaloproteinases e dos inibidores estudados no sítio de implantação trofoblástica nas gestações ectópicas ampulares; entretanto, não há uniformidade de expressão isolada, ou da razão metaloproteinases/inibidor, em relação aos graus de invasão trofoblástica.

Descritores: Gravidez ectópica; Metaloproteinases; Metaloproteinases da matriz; Inibidores de metaloproteinases de matriz; Inibidores teciduais das metaloproteinases.

ABSTRACT

Gomez UT. *Evaluation of the expression of metalloproteinases and its inhibitors at the trophoblastic implantation site in ectopic ampullary gestations* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

OBJECTIVES: The present study aims to investigate the qualitative and quantitative expressions of metalloproteinases (MMP) and its inhibitors (TIMP), at the trophoblastic implantation site, in ampullary ectopic pregnancies, and to correlate them with the degree of tubal invasion. **METHODS**: This was a prospective study including 34 patients diagnosed with ectopic ampullary gestation, who underwent salpingectomy between 2012 and 2013. A histological evaluation of the depth of trophoblastic invasion of the tubes obtained was performed. Next, the local expressions of the markers MMP-2, MMP-9 and MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 were studied in a qualitative and quantitative manner using indirect immuno histochemistry technique. Finally, the degree of invasion was correlated with the expression of each marker and the possible metalloproteinase/inhibitor ratios. **RESULTS:** In both qualitative and quantitative evaluations, MMP-2 (11,23%; 3,58 – 19,52) was the marker with the highest expression at the sites of implantation, whereas MMP-9 (2,23%; 0,19 – 5,39) and TIMP-3 (2,53%; 0,13 – 15,27) were only poorly expressed. There was a wide variation between the expressions of the markers and the metalloproteinase/inhibitor ratios when compared with the degrees of invasion. **CONCLUSION:** There is expression of the studied metalloproteinases and inhibitors at the trophoblastic implantation site in ectopic ampullary gestations; however, there is no uniformity in isolated expression or in the metalloproteinase/inhibitor ratio when compared to the degrees of trophoblastic invasion.

Descriptors: Pregnancy, ectopic; Metalloproteases; Matrix metalloproteases; Tissue inhibitor of metalloproteases; Matrix metalloprotease inhibitor.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A gravidez ectópica (GE) resulta da implantação do blastocisto em local diferente do endométrio da cavidade corporal do útero (Cunningham et al., 2018; Zugaib, 2019). A localização ectópica mais comum é a tuba uterina, que representa, aproximadamente, 95% dos casos, ocorrendo majoritariamente na porção ampular (70%) (Bouyer et al., 2002; Cunningham et al., 2018; Zugaib, 2019). É possível, também, a implantação em ovário (3%), cavidade abdominal (1%), colo uterino (menos de 1%) e cicatriz de cesárea preexistente (menos de 1%) (Cunningham et al., 2018; Zugaib, 2019).

A incidência relatada de GE é estimada em 1 a 2 % das gestações, mas não há dados precisos recentes (Zane et al., 2002; ACOG, 2018). Stulberg et al., em 2014, relataram uma taxa de 14,7 ectópicas por 1 000 gestações. Acredita-se que a frequência de GE entre as mulheres que procuram serviços de emergência com sangramento e/ou dor, no primeiro trimestre, varie de 6 a 18 % (Murray et al., 2005; Barnhart et al., 2006).

A hemorragia decorrente da GE representa, há muitos anos, importante causa de morbidade e mortalidade maternas. Nos Estados Unidos, entre 1980 e 1984, ocorriam 1,15 óbitos por GE a cada 100 000 nascidos vivos (Creanga et al., 2011). Apesar da tendência de queda, os números ainda são elevados: entre 2003 e 2007, eram 0,50 mortes a cada 100 000 (Creanga et al., 2011). Nos Estados Unidos, ainda é a principal

causa de óbito relacionada à gravidez no primeiro trimestre, correspondendo a 4% (Berg et al., 2010; Creanga et al., 2011); e a 2,7% de todas as mortes relacionadas à gestação (Creanga et al., 2017).

Apesar da evidente gravidade da doença, estima-se que, aproximadamente, 40 a 50% dos casos não sejam identificados corretamente na primeira avaliação hospitalar (Abbot et al., 1990). Por isso, tem sido constante, em especial nos últimos vinte anos, a busca por ferramentas que permitam otimizar seu diagnóstico (Barnhart, 2009; Creanga et al., 2011; Stulberg et al., 2016; Creanga et al., 2017). Inicialmente, o objetivo era, especificamente, a redução da morbimortalidade mas, atualmente, busca-se também a preservação da fertilidade da mulher (Cartwright et al., 2009; Lu et al., 2017).

A causa primária da GE é a alteração da anatomia tubária, macro e/ou microscópica (De Cecco et al., 1984; Qiu et al., 2011), associada ou não ao prejuízo da atividade ciliar e muscular (Shaw et al., 2010). Sabe-se que várias condições estão envolvidas em sua patogênese, mas acredita-se que, de forma geral, sejam resultado de condições que atrasem ou impeçam a passagem do oócito fertilizado para a cavidade uterina (Shaw et al., 2010). Acredita-se, também, que outras situações possam influenciar a implantação do blastocisto na tuba uterina (Shaw et al., 2010). Dentre essas, podem ser citados fatores inerentes ao embrião (Revel et al., 2008), à topografia tubária da implantação (Senterman et al., 1988) e à ação de proteínas séricas ou extracelulares, como as citocinas, as prostaglandinas e os fatores de crescimento (Attar, 2004).

Sabe-se que o grau de disfunção tubária relaciona-se, diretamente, à profundidade da invasão trofoblástica (Green; Kott, 1989), o que faz do diagnóstico precoce o fator determinante para o sucesso do tratamento da GE (Alkatout et al., 2013). A demora em identificar a doença permite sua evolução e piora o prognóstico, impossibilitando a instituição de tratamentos conservadores, como o expectante e o medicamentoso, atualmente considerados o padrão-ouro. Com a maior frequência de intervenções cirúrgicas, crescem também os custos e a sobrecarga física e emocional para as pacientes (Shaw et al., 2012).

Atualmente, sabe-se que a dosagem da fração beta da gonadotrofina coriônica humana (βhCG) (Oktay et al., 1994; Klein et al., 1995; Kiss et al., 1997; Cabar et al., 2006; Erol et al., 2015a) e a ultrassonografia (Cacciatore et al., 1990a; Cacciatore, 1990b; Brown et al., 1991; Pereira et al., 2009; Erol et al., 2015b) têm importância consagrada não apenas para o diagnóstico da GE, mas também para o prognóstico e definição do tratamento, visto que se relacionam ao grau da invasão e, portanto, ao dano tubário. Sabe-se que valores séricos do hormônio acima de 5 000 mUI/mL, assim como o achado de atividade cardíaca embrionária ao exame de ultrassom transvaginal, associam-se ao acometimento da camada serosa da tuba, indicando-se, nesses casos, tratamento cirúrgico, pela impossibilidade de recuperação da tuba após uma conduta conservadora. Por outro lado, valores de até 2 400 mUI/mL e a observação de imagem anecoica com halo hiperecogênico em região anexial (“anel tubário”) estão relacionados à invasão mais superficial,

podendo-se considerar as condutas expectante e medicamentosa como opções terapêuticas (Cabar et al., 2006; Pereira et al., 2009).

Paralelamente, entretanto, tem-se dado mais ênfase aos mecanismos celulares e moleculares relacionados à doença, uma vez que a fisiopatologia da implantação ectópica do blastocisto, a esse nível, é muito pouco conhecida (Shaw et al., 2010; Shao et al., 2012a, b, c), e os biomarcadores vêm apresentando papel significativo. Um biomarcador corresponde a uma característica que possa ser medida objetivamente e que sinalize determinada condição clínica, biológica ou patológica (Raush; Barnhart, 2015). Para serem adequados, devem ser mensuráveis com pouca ou nenhuma variabilidade e acompanhar, de maneira rápida e confiável, mudanças dessas condições (Aronson; Ferner, 2017).

Em nível sérico e tecidual, mais de vinte biomarcadores preditores da invasão trofoblástica já foram identificados, porém, até o momento, nenhum deles demonstrou, isoladamente, relacionar-se diretamente ao estágio da doença (Cartwright et al., 2009; Horne et al., 2010; Dhiman et al., 2016). Dentre eles, podem ser citados os marcadores de crescimento trofoblástico e embrionário anormal (gonadotrofina coriônica, proteína A plasmática gestacional ou PAPP-A, hormônio lactogênio placentário, alfafetoproteína, ativina A), marcadores de funcionamento anormal do corpo lúteo (progesterona, estradiol, inibina A, relaxina), marcadores de crescimento intratubário (creatinoquinase, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mioglobina), marcadores inflamatórios e de irritação peritoneal (CA-125, interleucinas) e marcadores de implantação intrauterina anormal

(glicodelina ou proteína placentária-14) (Cabar et al., 2008; Cartwright et al., 2009).

Dentre esses marcadores, estão as metaloproteinases de matriz (MMP, do inglês *matrix metalloproteinases*), e os inibidores das metaloproteinases (TIMP, do inglês *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Essas moléculas são enzimas multifuncionais do grupo das proteinases (Iyer et al., 2012) que participam de diversos processos biológicos, como embriogênese, remodelamento tecidual e angiogênese (Visse; Nagase, 2003). Sua importância clínica em diversas áreas, dentre as quais se destacam a fisiopatologia de tumores, endometriose, artrite e de eventos cardiovasculares, tem sido investigada desde 1988 (Iyer et al., 2012).

As MMPs secretadas pelo citotrofoblasto (Qiu et al., 2011) são responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC), passo seguinte à penetração inicial das células trofoblásticas na membrana basal do epitélio superficial (Junqueira; Carneiro, 2017). Apesar de estudos em humanos serem raros (Qiu et al., 2011), modelos experimentais em animais sugerem que o balanço MMP-TIMP, na interface maternoembrionária, seja fator determinante tanto do grau de invasão trofoblástica, quanto da manutenção da homeostase do ambiente uterino durante a gestação (Das et al., 1997; Qiu et al., 2011).

Em relação à GE, as MMPs e seus inibidores começaram a ser estudados no fim do século passado (Bjørn et al., 1997; Kucera et al., 2000). Entretanto, poucos estudos foram publicados, desde então, com esse tema específico. Existe investigação sobre a relação entre concentração sérica

das MMPs e alguns desfechos obstétricos adversos (Dietl et al., 1988; Ke et al., 2006; Kocarslan et al., 2015; Chen; Khalil, 2017; Feng et al., 2017), dentre os quais a GE (Bjørn et al., 1997; Kucera et al., 2000; Bai et al., 2005; Qiu et al., 2011; Rajtar-Ciosek et al., 2016; Senapati et al., 2016), além de estudos sobre a expressão dessas proteínas na interface trofoblasto-decídua (Hurskainen et al., 1996; Qin et al., 1997; Huppertz et al., 1998; Hurskainen et al., 1998; Goldman et al., 2003; Anacker et al., 2011), mas todos se concentram, especialmente, nos diferentes tipos de células trofoblásticas, com pouca menção, ou nenhuma, à profundidade da invasão da tuba uterina.

É fato que, ainda que se identifiquem novos biomarcadores, persistirá o desafio de sua aplicabilidade prática (Barnhart; Speicher, 2011). Mas é certo que elucidar a etiologia das variações na invasão trofoblástica tubária será de grande valia na busca por uma ferramenta que facilite o diagnóstico, prognóstico, e terapêutica da GE, reduzindo essa importante causa de morbimortalidade materna (Barnhart; Speicher, 2011; Senapati; Barnhart, 2013).

A Clínica Obstétrica do HCFMUSP é centro de referência para o diagnóstico precoce e tratamento da GE, recebendo, anualmente, número substancial de casos. Além disso, apresenta linhas de pesquisa estabelecidas sobre a doença. Dessa forma, investigamos a importância das MMPs e de seus inibidores no desenvolvimento dessa importante patologia obstétrica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo, envolvendo gestações tubárias ampulares, tem como objetivos:

- avaliar a expressão tecidual, no sítio de implantação trofoblástica, das metaloproteinases e de seus inibidores;
- avaliar a associação entre os graus de invasão trofoblástica e a expressão tecidual das metaloproteinases e de seus inibidores, no sítio de implantação trofoblástica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

No processo de nidação normal, as células do citotrofoblasto proliferam-se ao longo da gestação, diferenciando-se para formar, ao final, o sinciciotrofoblasto e o trofoblasto extraviloso (TEV) (Ji et al., 2013). Durante a invasão, o TEV expressa proteínas específicas que definem os diferentes processos e estágios de invasão, dentre as quais estão as MMPs (Harris, 2010), responsáveis por degradar a MEC (Lala; Graham, 1990; Burrows et al., 1996). A ação dessas MMPs é regulada por seus inibidores teciduais (TIMPs) (Lala; Graham, 1990; Burrows et al., 1996).

3.1 Invasão trofoblástica na parede tubária em gestações ectópicas

Existe divergência, entre os autores dos principais estudos, em relação à histopatologia da invasão trofoblástica na GE. Enquanto alguns a consideram superficial, com lesão de mucosa e distensão do lúmen tubário (Stock, 1985; Pauerstein et al., 1986; Senterman et al., 1988; Stock, 1991), outros entendem que a invasão é mais agressiva seguindo-se, à penetração na mucosa, o acometimento de camadas mais profundas (Budowick et al., 1980; Randall et al., 1987, Dietl et al., 1988). Green e Kott, em 1989, estudando fatores de risco associados à GE, afirmaram que o desenvolvimento trofoblástico ectópico pode ser tanto superficial quanto

profundo, e sugeriram o que se acredita até hoje: que a disfunção tubária depende da profundidade de invasão do trofoblasto.

Oktay et al., já no início da década de 90, comprovaram que a invasão miosalpíngea e a massa trofoblástica viável estavam associadas aos níveis séricos de βhCG na gravidez tubária. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Klein et al., em 1995, concluíram que o crescimento trofoblástico na GE, quando puramente intraluminal, era significativamente mais frequente nas pacientes com valores de βhCG menores que 2 500 mUI/mL (p= 0,0045).

Em estudo prospectivo cego clássico, de Natale et al., em 2003, foi avaliada a relação entre idade gestacional, diâmetro ultrassonográfico das massas e níveis séricos de hCG e os diferentes estágios de infiltração trofoblástica da parede tubária. Para isso, foram estudadas as tubas de 37 pacientes, removidas por laparoscopia, e classificadas de acordo com a profundidade da infiltração trofoblástica: trofoblasto limitado à mucosa tubária (estágio I), extensão à musculatura tubária (estágio II) ou infiltração completa da parede tubária até a serosa, descontinuada pelas células trofoblásticas (estágio III). Quinze pacientes (40,5%) apresentaram infiltração tubária estágio I, 14 (37,8%), infiltração estágio II e oito (21,6%), infiltração estágio III. A idade gestacional e o diâmetro da tuba não diferiram entre os três grupos, mas a mediana do nível de hCG apresentou correlação positiva com o grau de infiltração na parede tubária: 1 710,5 mUI/mL (variação de 113 a 5 635 mUI/mL) para pacientes com infiltração em estágio I; 4 690 mUI/mL (variação de 150 a 2 531 mUI/mL) para pacientes com infiltração no

estágio II e 15 700 mUI/mL (variação de 13 809 a 21 650 mUI/mL) para pacientes com infiltração de estágio III. Todas as pacientes com níveis de hCG acima de 6 000 mUI/mL apresentaram invasão no estágio II ou III.

Cabar et al., em 2006, utilizando a mesma classificação proposta por Natale, porém com casuística maior (n=105), concluíram que a βhCG sérica é o melhor preditor da profundidade da invasão do trofoblasto na parede tubária. Não foi observada associação entre a profundidade da invasão trofoblástica e a idade gestacional (p= 0,53) ou diâmetro da massa tubária (p= 0,43) à ultrassonografia. A invasão trofoblástica foi, no entanto, associada à concentração de βhCG (p< 0,001) e ao tipo de imagem ultrassonográfica (p= 0,001). Os níveis de βhCG de 2 400 mUI/mL apresentaram sensibilidade de 82,8% e especificidade de 85,5% para o estágio I de invasão, enquanto os níveis de 5 990 mUI/ml apresentaram sensibilidade de 82,6% e especificidade de 74,6% para o estágio III. Elito Jr et al. (2014), recentemente, confirmaram essa associação em um estudo prospectivo com 27 pacientes.

Cacciatore et al., em 1990, sugeriram, pela primeira vez, que a condição de uma gravidez tubária poderia ser prevista, confiavelmente, a partir de achados do ultrassom transvaginal. A partir do estudo prospectivo das tubas de 120 pacientes submetidas à salpingectomia, compararam os resultados da ultrassonografia transvaginal aos cirúrgicos e aos níveis séricos de βhCG, observando que o achado de anel tubário, visto em 74 das mulheres (61,7%), sugeria fortemente uma tuba uterina intacta. Por outro lado, dentre as 39 mulheres (32,5%) nas quais a massa anexial complexa

era o achado ultrassonográfico, vinte apresentaram um hematoma tubário e seis, ruptura da tuba.

Pereira et al., em 2009, utilizando a classificação proposta por Natale et al. (2003), investigaram a associação entre a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária (avaliada em exame histológico pós-operatório) e os achados da ultrassonografia transvaginal em mulheres com GE ampular. Os autores concluíram que a presença de atividade cardíaca embrionária está associada à penetração mais profunda, quando comparada à observação de um anel tubário ($p < 0,001$). Para chegar a essa constatação, foram analisadas 85 tubas, nas quais se havia observado um dos seguintes critérios: embrião com atividade cardíaca ou anel tubário. Dentre as pacientes em que um embrião com atividade cardíaca havia sido identificado, todas apresentaram graus II (17,9%) ou III (82,1%) de invasão, enquanto naquelas em que o achado foi o anel tubário, o grau I foi o mais frequente (41,3%).

Em 2010, quando avaliaram a associação entre a profundidade de penetração trofoblástica na parede tubária e as concentrações séricas de βhCG, Cabar et al. estudaram também a correlação da profundidade da invasão trofoblástica com as concentrações séricas maternas de VEGF, e observaram que quanto maior é o grau de invasão, maior é a concentração sérica desse marcador. Assim como as MMPs, o VEGF também é sintetizado pelo trofoblasto (Charnock-Jones et al., 1994). Uma vez que a hipóxia estimula a produção de VEGF, acredita-se que, na placenta, ele esteja envolvido na angiogênese durante o início da gravidez (Shore et al.,

1997). Apesar de alguns estudos não terem concluído essa relação (Kucera-Sliutz et al., 2002; Ugurlu et al., 2009), considera-se que a concentração sérica de VEGF nas pacientes com GE seja maior do que naquelas com gestações intrauterinas (Daniel et al., 1999; Felembam et al., 2002; Mueller et al., 2004).

Sabendo da associação da invasão trofoblástica à concentração de βhCG ($p < 0,001$) e ao tipo de imagem ultrassonográfica ($p = 0,001$), os mesmos autores, em 2015, buscaram, avaliar a relação entre imagens ultrassonográficas e concentrações séricas de VEGF nas gestações ampulares. O estudo prospectivo, com 50 pacientes, evidenciou associação positiva entre imagens ultrassonográficas e concentrações séricas de VEGF, uma vez que os embriões ectópicos com atividade cardíaca estiveram associados a níveis mais elevados de VEGF sérico. Concluíram, portanto, que, na gestação ampular, o achado de embrião com atividade cardíaca à ultrassonografia transvaginal, que sugere invasão profunda, associa-se a níveis séricos mais altos de VEGF. Em 2016, em estudo transversal prospectivo, confirmaram que as concentrações séricas do VEGF materno têm relação com o grau de invasão trofoblástica na parede tubária. Entretanto, os valores absolutos da concentração de VEGF foram inversamente proporcionais ao grau de invasão, contrariando o achado de 2010. A mediana da concentração sérica de VEGF foi 69,88 pg/mL para o grau I, 14,53 pg/mL para o grau II e 9,08 pg/mL para o grau III, com diferença estatística significativa entre os graus I e III. Baseando-se na curva ROC, a concentração sérica de VEGF de 25,9 pg/mL diferenciou o grau I

dos graus II e III com uma sensibilidade de 75%, especificidade de 76,9% e área sob a curva de 0,798. Os autores concluíram que, diante dos resultados, mais estudos seriam necessários para compreender melhor o tema.

Antes disso, considerando o valor de VEGF sérico um preditor de invasão trofoblástica, Lam PM et al., em 2004, avaliaram a concentração tecidual desse marcador. Observando a expressão de RNA mensageiro (mRNA) do VEGF e de seus receptores por SEM (*Scanning Electron Microscopy*), nas gestações ectópicas ampulares, os autores demonstraram diferença significativa entre os locais de implantação e de não implantação. Além de ser diretamente proporcional à dosagem sérica de hCG ($p < 0,01$), a expressão do mRNA do VEGF e de seus receptores foi significativamente maior no local de implantação, em comparação com o sítio de não implantação ($p < 0,01$).

Por outro lado, Teshima et al., em 2015, encontraram resultado distinto. A partir da análise de cortes histológicos de 34 tubas representadas por oito casos (23,53%) de invasão trofoblástica grau I, sete (20,59%) de grau II e dezenove (55,88%) de grau III, concluíram que a concentração sérica de VEGF não se relaciona com a sua expressão tecidual na interface maternoembrionária. Dessa forma, a profundidade de penetração do trofoblasto na porção ampular da parede tubária não se relacionou a uma maior expressão tecidual do VEGF.

3.2 Metaloproteinases e seus inibidores

As metaloproteinases da matriz (MMPs), ou matrixinas, e seus inibidores (TIMPs) são enzimas responsáveis pela degradação da MEC, e têm sido estudados desde 1962 (Birkedal-Hansen, 1988).

Para ser denominada metaloproteinase, uma enzima deve atender a alguns requisitos: 1) degradar, ao menos, um componente da MEC; 2) ser catalisada pelo zinco; 3) ser ativada por outras proteinases ou por organomercúrios; 4) ser inibida pelo ácido etilenodiaminotetracético, 1,10-fenantrolina ou um dos TIMPs; e 5) ser estruturalmente semelhante à MMP-1 (Osenkowski et al., 2004).

Para identificação, cada membro da família das MMP é caracterizado por um número. Inicialmente foram descritas as MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -9 e -10, e os inibidores teciduais de metaloproteinases TIMP-1 e -2 (Iyer et al., 2012). Atualmente existem identificadas 25 MMPs, mas apenas 23 delas são encontradas em humanos (Visse; Nagase, 2003; Iyer et al., 2012).

As MMPs compartilham uma estrutura central comum. Consistem em um propeptídeo de, aproximadamente, 80 aminoácidos, um domínio catalítico, de cerca de 170 aminoácidos, um peptídeo de ligação, de comprimento variável, e um domínio de hemopexina, de cerca de 200 aminoácidos. O propeptídeo quela o zinco, mantendo as MMPs na sua forma latente e o domínio catalítico confere especificidade a cada MMP (Cui et al., 2017).

A família das MMP divide-se em subgrupos, que se baseiam em seu substrato *in vitro*: colagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2 e -9), matrilisinas (MMP-7, -26), estromelisinas (MMP-3, -10) e MMP tipo membrana (MT-MMPs) (Lindsay; Zamilpa, 2012). Essa classificação é, de certa forma, arbitrária, já que diversas MMPs clivam mais de um tipo de substrato. Como exemplo, pode-se citar a MMP-14, que é atribuída ao subgrupo do tipo de membrana, mas também pode ser classificada como uma colagenase (Seiki et al., 2003).

Embora haja alguma seletividade, os substratos das MMPs se sobrepõem aos subgrupos. A osteopontina, por exemplo, é degradada tanto pela MMP-2 quanto pela MMP-9 (Christensen et al., 2010); a laminina, pela MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (Tochowicz et al., 2007; Qian et al., 2018). De forma similar, todos os TIMPs podem, em algum grau, inibir todas as MMPs (Lindsay; Zamilpa, 2012). O TIMP-1 pode inibir todas as MMPs de forma eficiente, exceto a MMP-14, e apresenta maior afinidade com a MMP-9 em relação à MMP-2. O TIMP-2 tem maior afinidade com a MMP-2 do que com a MMP-9. O TIMP-3 pode inibir as MT-MMPs e as proteases não-MT-MMPs (Olson et al., 1997).

Diversas proteases podem degradar a MEC, mas acredita-se que sejam as MMPs os mediadores mais relevantes para essa função. Isso acontece, principalmente, porque o pH ideal para sua ação enzimática é próximo de neutro; além do fato de serem proteínas secretadas diretamente no local da sua função (Matrisian, 1992). A lise da MEC é fundamental em diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de tecidos, a

cicatrização de feridas, a angiogênese e a embriogênese; e em processos patológicos (Kleiner; Stetler-Stevenson, 1993; Visse; Nagase, 2003; Staun-Ram; Shalev, 2005), como a progressão tumoral (Westermarck; Kahari, 1999) e a endometriose (Bruner-Tran et al., 2006), cujos mecanismos de crescimento, invasão e adesão são muito similares (Yang et al., 2004).

Existe maior conhecimento sobre a MMP-2 e a MMP-9, pois são quantificadas há mais tempo, com mais facilidade (Tyagi et al., 1996). Mas, atualmente, muitas outras estão sendo estudadas, particularmente a MMP-7 e a MMP-14 (Chiao et al., 2010; Zavadzkas et al., 2011; Lindsay; Zamilpa, 2012).

A MMP-2 também é denominada colagenase da gelatinase-A ou do tipo IV. Ela possui um *locus* gênico no cromossomo 16q13-q21. A MMP-2 está envolvida, entre outros processos, na angiogênese, no reparo tecidual e na inflamação. Em associação a seus inibidores TIMP-1 e -2, tem papel fundamental na invasão tumoral e na metástase. Acredita-se que o desequilíbrio da razão MMP-2 / TIMP-1 ou MMP-2 / TIMP-2 possa contribuir para a progressão dos tumores, como o de esôfago, o mamário, os do sistema nervoso central e os pulmonares. A MMP-2 cliva os colágenos I, II e III de forma muito semelhante às colagenases, em duas fases, mas sua atividade colagenolítica é muito mais fraca. Porém, como o precursor da MMP-2, o proMMP-2, é recrutado para a superfície celular para clivagem pelo complexo MT1-MMP / TIMP-2, acumula-se pericelularmente, o que aumenta sua atividade colagenolítica nesse local. A MMP-2 pode ser ativada

por todas as outras MMPs, exceto a MT4-MMP, ou MMP-17 (Nagase et al., 2006; Cui et al., 2017).

A MMP-9, ou gelatinase-B, também é uma colagenase do tipo IV, e possui um *locus* gênico no cromossomo 20q11.2-q13 (Cui et al., 2017). Assim como a MMP-2, ela também digere a gelatina a partir da fibronectina tipo II, mas seu mecanismo de ação é diferente (Nagase et al., 2006). É produzida por diversos tipos de células, incluindo as epiteliais, os fibroblastos, queratinócitos e osteoblastos, as células dendríticas, os granulócitos e as células-T e cocleares. Nestas últimas, desempenha papel fundamental na migração de células inflamatórias e no comportamento destrutivo do colesteatoma. Em pacientes com rinossinusite crônica, parece apresentar expressão mais intensa e, em ratos, aparenta estar associada à cicatrização da córnea (Mauris et al., 2014). A MMP-9 também induz a migração de macrófagos, sendo produzida também por eles. Foi, ainda, detectado que, como a MMP-2, no câncer de esôfago, associa-se à sua invasão vascular (Cui et al., 2017).

As MMPs não são apenas responsáveis pela degradação dos substratos da MEC. São, também, ativadoras de outras MMP (Chakraborti et al., 2003; Cauwe; Opdenakker, 2010). A MMP-14 é o principal exemplo dessa característica: é uma MMP do tipo membrana, com atividade colagenolítica; porém, uma das suas principais funções é ativar a pro-MMP-2 (Bjørn et al., 1997; Nagase et al., 2006). Entretanto, não converte a MMP-2 diretamente em sua forma ativa. A conclusão desse processo depende da concentração da própria MMP-2. A MMP-14, assim como as outras MMPs

do subgrupo membrana, caracteriza-se pela ativação intracelular e migração da enzima ativa para a superfície. Seu *locus* gênico está no cromossomo 14q11-q12. As MT-MMPs possuem domínios de ancoragem à membrana, sendo ótimas proteases pericelulares. Além disso, a MMP-14 promove a migração de vários tipos de células. É uma das principais proteases na invasão e metástase de vários cânceres, estando presente em todos os tipos de carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço, além dos pulmonares (Cui et al., 2017). Ainda, tem função crucial no metabolismo do tecido conjuntivo: camundongos deficientes em MMP-14 apresentam dismorfismo craniofacial, artrite, osteopenia, nanismo e fibrose dos tecidos moles (Holmbeck et al., 1999).

Paralelamente ao que ocorre com as MMPs, que são multifuncionais, os TIMPs não agem apenas como inibidores, possuindo também função de fatores de crescimento (Hoegy et al., 2001). Além disso, estimulam a proliferação de fibroblastos e a diferenciação dos miofibroblastos (Lovelock et al., 2005).

A primeira estrutura tridimensional dos TIMPs foi demonstrada em 1994. No entanto, não se compreendia, inicialmente, como eles inibiam as MMPs (Nagase, 2016). Hoje, sabe-se que se ligam a elas na proporção de 1:1 (Bode et al., 1999). Os TIMPs têm pesos moleculares de, aproximadamente, 21 quilodáltons e são variavelmente glicosilados. Têm seis ligações do tipo dissulfídicas, e um domínio nitrogênio-terminal associado a um carbono-subdomínio. A maioria das funções das TIMPs é atribuível às sequências de aminoácidos dentro do domínio nitrogênio-

terminal, embora os subdomínios de carbono também interajam com os domínios catalíticos de algumas MMPs, e com os domínios de hemopexina da MMP-2 e da MMP-9 (Brew et al., 2000).

Uma mudança na proporção MMP / TIMP pode alterar a atividade específica dessas proteases (Bode et al., 1999). Em carcinomas de células salivares, a ativação da proMMP-2 correlacionou-se, diretamente, com a razão MMP-14 / TIMP-2 (Kayano et al., 2004). Estudos sugerem que células com alta expressão de MMP-14 e baixa expressão de TIMP-3 sejam prevalentes em placas ateroscleróticas propensas à ruptura, independentemente da ativação pró ou anti-inflamatória (Cui et al., 2017).

Em relação à gestação, desde a década de 1990, já existem evidências da expressão de várias MMPs e TIMPs na decídua (Hurskainen et al., 1996; Qin et al., 1997; Huppertz et al., 1998; Hurskainen et al., 1998; Goldman et al., 2003). Acredita-se que o equilíbrio entre eles seja crucial para o implante do trofoblasto na gravidez normal (Autio-Harmainen et al., 1992; Bjørn et al., 1997; Morgan et al., 1998; Xu et al., 2001).

Niu et al. (2000) quantificaram níveis de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em meios de cultura de órgãos placentários, em diferentes fases da gestação e em culturas primárias de trofoblasto, e observaram secreção ativa de MMP-2, no primeiro trimestre, além de produção constante de TIMPs ao longo da gestação. No ano seguinte, Xu et al. (2001) demonstraram, em modelo *in vitro*, que algumas proteínas da MEC, como a laminina e a fibronectina, promovem a migração dos citotrofoblastos pela expressão de MMP-9, TIMP-1 e TIMP-3. Isaka et al., em 2003, sugeriram

que a capacidade invasiva dos trofoblastos poderia ser regulada pela atividade enzimática das MMPs, a partir da expressão de MMP-2 em trofoblastos extravilosos, e da MMP-9, em citotrofoblastos vilosos, no primeiro trimestre.

De forma semelhante, Staun-Ram et al. publicaram, em 2004, estudo em que examinaram a invasividade dos trofoblastos do primeiro trimestre, de acordo com o perfil de secreção de MMP-2 e -9 em diferentes estágios gestacionais. Concluíram que os trofoblastos do primeiro trimestre expressam as MMP de acordo com a fase da gestação: em trofoblastos precoces, a MMP-2 é a principal gelatinase, e enzima chave para a penetração trofoblástica; já no final do primeiro trimestre, tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 são relevantes para a invasão.

Mais recentemente, Anaker et al. (2011) demonstraram que todas as MMPs e TIMPs expressam-se em fibroblastos deciduais e trofoblastos, com exceção das MMPs -20 e -25. Observando decíduas humanas saudáveis, obtidas durante o primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação, além de populações de células deciduais isoladas, os autores observaram grande variedade de MMPs presentes na interface “fetomaterna” humana. Dessa forma, acreditam que isso seja reflexo de seu efeito altamente invasivo e modelador, e sugerem que a expressão e o balanço entre MMPs e TIMPs estejam relacionados ao potencial invasivo do trofoblasto (Anacker et al., 2011), tendo em vista a participação efetiva desses marcadores no remodelamento vascular durante a placentação (Hale et al., 2011, Chen; Khalil, 2017).

Por outro lado, pressupõe-se que possíveis falhas nesse mecanismo estejam relacionadas a alterações na placentação, ao causarem inadequação da degradação da MEC (Zhu et al., 2014).

Apesar da necessidade de mais estudos, há evidências de maior expressão das MMPs, especialmente da MMP-2 e da MMP-9, e de seus inibidores, nas decíduas e líquido amniótico de pacientes com pré-eclâmpsia (Lockwood et al., 2008; Lavee et al., 2009; Montagnana et al., 2009) e hipertensão gestacional (Palei et al., 2008). No acretismo placentário, esses dois marcadores, além do TIMP-1, parecem ter participação significativa, enquanto o TIMP-2 tem papel a esclarecer (Ke et al., 2006). Em trabalho publicado por Tency et al., em 2012, os autores demonstraram maior razão MMP-9 / TIMP-1 e MMP-9 / TIMP-2 em mulheres em trabalho de parto prematuro em relação a outras da mesma idade gestacional, e àquelas em trabalho de parto no termo.

Em relação à gestação inicial, tem-se observado maior dosagem sérica de MMP-9 e da relação MMP-2 / TIMP-2, nos casos de abortamento, quando comparadas às de gestações em curso, que têm nível maior de TIMP-1 e TIMP-2 (Nissi et al., 2013). De forma semelhante, pacientes com perdas gestacionais que apresentaram sangramento aumentado demonstram maior expressão tecidual de MMP-9 nos vilos, e de TIMP-2, nas decíduas (Zhuang et al., 2014). Sabe-se que o desbalanço entre a MMP-2 e o TIMP-2, e entre a MMP-9 e o TIMP-1 tem papel importante, também, na fisiopatologia das doenças trofoblásticas gestacionais benignas, assim como nas de caráter invasivo (Ding et al., 2007; Rahat et al., 2016).

Na GE, a diferenciação trofoblástica apresenta características bastante semelhantes às de diversas situações patológicas da gestação (Bai et al., 2005). Na tuba uterina, o menor número de células deciduais favorece a invasão profunda e mais agressiva (Glasser et al., 2002; Qiu et al., 2011), devido ao contato direto do trofoblasto com o tecido muscular subjacente à mucosa, levando à penetração excessiva e sangramento (Dietl et al., 1988). A etiologia molecular, entretanto, é desconhecida. É possível que as MMPs e TIMPs alterem a invasão trofoblástica na tuba uterina, de forma semelhante ao que ocorre na gestação normal.

3.3 Metaloproteinases e seus inibidores e gestação ectópica

Bjørn et al., em 1997 e em 2000, avaliaram a expressão espacial de mRNA da MMP-2 e da MT1-MMP (MMP-14) nas GEs, e demonstraram que essas MMPs estão presentes na interface “fetomaterna”. Os autores estudaram placentas humanas de gestações tópicas (n=11) e de tecido trofoblástico proveniente de GEs (n=8) com idades gestacionais de sete a onze semanas. A partir de técnicas de hibridização *in situ,* e coloração de citoqueratina, para identificação de tecido trofoblástico e epitelial, observaram que, do lado fetal, nas duas situações, os dois marcadores foram altamente expressos. A MMP-2 e a MMP-14 localizaram-se, simultaneamente, nos diversos tipos de citotrofoblastos, desde os iniciais até os mais profundos. Verificaram que o mecanismo de ativação da MMP-2 mediada pela MMP-14, sugerido previamente (Cao et al., 1995), estava

mantido na GE, de forma similar ao de gestações intrauterinas. Dessa forma, não pôde ser observada maior expressão dessas MMPs na tuba, invalidando a hipótese de serem a causa de invasão mais profunda nesse local. Os autores observaram também que, em gestações tubárias, do lado materno, células deciduais e estromais eram geralmente positivas para a MMP-2, mas negativas para a MMP-14. Apesar de a última também apresentar positividade em algumas células, as expressões de ambas ocorreram sempre de forma menos intensa do que nos tecidos trofoblásticos.

Bai et al. (2005) examinaram a expressão, nas GEs, de MMP-2, -9 e -14 e de TIMP-1, -2 e -3, na interface “fetomaterna”. A partir de técnicas de imuno-histoquímica e de hibridização *in situ,* foram estudadas 23 tubas, obtidas de salpingectomias realizadas entre três e nove semanas de gestação. Do lado fetal, observaram que a MMP-9 e os TIMP-1, -2 e -3 eram produzidos por todos os tipos de células do trofoblasto extraviloso, enquanto a MMP-2 e a -14 existiam, principalmente, em sua porção distal, mais invasiva. Por outro lado, todos os marcadores foram detectados nas células do trofoblasto viloso, com a MMP-2 e a MMP-9 apresentando padrões de expressão bastante semelhantes nessas células. Ainda no trofoblasto viloso, os TIMPs -1 e -2 apresentaram padrão similar de expressão, que aumentou conforme a profundidade da invasão, em direção ao interstício materno, enquanto o TIMP-3 manteve expressão estável. Observaram, ainda, que a imunorreatividade da MMP-9 e dos TIMP-1 e -3 aumentou com a progressão da gestação, enquanto a do TIMP-2 diminuiu com a evolução da GE, entre a terceira e a nona semanas. A imunorreatividade da MMP-2 e da MMP-14

permaneceu estável no decorrer das semanas. No lado materno, todos os marcadores estiveram presentes nas células epiteliais; já no estroma, as MMPs estudadas estavam ausentes, enquanto os TIMPs apresentaram expressão leve.

Dubernard et al., em 2005, também avaliaram, por imuno-histoquímica, a presença de diversas proteínas, dentre as quais algumas MMPs, no trofoblasto viloso e extraviloso, nas GEs. O objetivo era especificar e localizar as expressões dos marcadores, e correlacionar com as de gestações tópicas. Observaram que a MMP-2, a MMP-9 e a MMP-11 estavam presentes na porção distal do EVT, diferentemente do que ocorria nas gestações intrauterinas. Os autores sugeriram que essa distribuição de MMPs poderia estar relacionada a uma falha de decidualização nas gestações tubárias.

Em 2000, pela primeira vez, foi comparada a expressão das MMPs e de seus inibidores com a profundidade da invasão trofoblástica nas GEs. Os marcadores MMP-1, MMP-2 e TIMP-2 foram estudados. Para identificar sua expressão, Kucera et al. estudaram, retrospectivamente, 15 amostras de tecido de pacientes com gravidez tubária do primeiro trimestre, obtidas por salpingectomia laparoscópica, rotas (n= 7) e não rotas (n= 8). Após receberem coloração imuno-histoquímica para esses marcadores, as lâminas das amostras foram fotografadas e digitalizadas, para uma análise de imagem quantitativa computadorizada. Assim, as porcentagens médias de áreas coradas por anticorpos para MMP-1, MMP-2 e TIMP-2, no trofoblasto extraviloso, foram determinadas. Os autores observaram que,

nas 15 amostras, as expressões da MMP-1 e do TIMP-2 foram mais significativas do que as da MMP-2. No entanto, não foi obtida diferença significativa entre as expressões quando comparadas as gestações tubárias rotas e não rotas. Apesar disso, sugeriram que a MMP-1, a MMP-2 e o TIMP-2 estariam funcionalmente envolvidos na primeira fase, altamente proliferativa, do implante ectópico.

Qiu et al., em estudo prospectivo publicado em 2011, também buscaram correlacionar a expressão das MMPs e os graus de invasão da parede tubária. Investigaram, em 18 gestações ampulares íntegras, a expressão de MMPs e TIMPs, no sítio de implantação, e nos locais da tuba em que ela não havia ocorrido. Utilizaram, mais uma vez, a imuno-histoquímica para detectar MMP-2, -9 e -14 e TIMP-1, -2 e -3, e associaram à avaliação os níveis séricos de βhCG. Para comparação, utilizaram a classificação de Natale et al. (2003). A expressão foi quantificada como ausente, fraca, moderada ou forte. Como demonstrado em estudos anteriores (Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006), uma diferença significativa nas concentrações de βhCG foi observada entre as invasões nos estágios I (n=11) e II (n=7). Do lado fetal, foi observada imunorreatividade intensa para MMP-2, em todos os tipos de células, seguindo-se a MMP-14, sendo que a última apresentou aumento importante em direção ao interstício materno. A MMP-9 expressou-se menos, concentrando-se na porção apical do tecido trofoblástico viloso. Ainda na face fetal, o TIMP-1 e o TIMP-2 apresentaram expressão menor, mas semelhante, em quase todo o tecido, também com padrão crescente em

direção à face materna. O TIMP-3 expressou-se especialmente no sinciciotrofoblasto. No lado materno, as expressões de MMP-2, MMP-14 e TIMP-3 foram observadas no epitélio e no músculo liso, enquanto as de MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 estiveram fracas ou ausentes nesses locais. Os autores concluíram, então, que o desequilíbrio entre a expressão de MMPs e TIMPs pode levar à degradação destrutiva da matriz extracelular nos locais de implantação ectópica.

Recentemente, Balci e Özdemir (2019) avaliaram as expressões das MMPs em amostras de tecido placentário constituídas por 12 GEs tubárias, porém sem relacioná-las ao grau de invasão. Células trofoblásticas e áreas de implantação foram avaliadas para MMP-3 e MMP-9 por imuno-histoquímica, e os autores observaram expressão de MMP-9 mais elevada nos espécimes de gravidez tubária quando comparados aos de abortamentos provocados, com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de análise secundária de estudo prospectivo, 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.

Foi encaminhado adendo ao projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (processo 481791/2011-6) **(Apêndice A)**.

4.1 Cálculo do tamanho da amostra

Como se trata de análise secundária do estudo de Cabar et al., de 2016, intitulado “Concentrações séricas do Fator de Crescimento Endotelial Vascular e a profundidade da invasão trofoblástica na gestação ectópica ampular”, foi utilizado o mesmo tamanho amostral. O cálculo amostral do estudo primário considerou, conforme literatura, que, em modelos de regressão, são necessários de sete a quinze casos para cada variável de desfecho, e que o tamanho da amostra deve respeitar a frequência de cada uma delas (Hair et al., 1998). Foram aplicadas as seguintes frequências aproximadas para as invasões trofoblásticos graus I, II e III, respectivamente: 27%, 28% e 45% (Cabar et al., 2006). Assim,

considerando-se quinze casos para cada variável explicativa (VEGF sérico e tecidual) e um mínimo de 25% em cada categoria de desfecho (invasão grau I, II e III), concluiu-se serem necessários sete pacientes em cada grupo.

O nível de significância adotado foi 5%.

4.2 Casuística

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo as pacientes que:

- apresentaram diagnóstico de gestação ectópica tubária não decorrente de utilização de técnicas de reprodução assistida;
- realizaram tratamento cirúrgico radical (salpingectomia);
- aceitaram participar.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas deste estudo as pacientes que:

- apresentaram diagnóstico intraoperatório de gestação tubária não ampular;
- apresentaram impossibilidade de análise anatomopatológica do produto da salpingectomia;

- apresentaram impossibilidade de análise da expressão das metaloproteinases e seus inibidores em lâminas elaboradas a partir do material cirúrgico.

4.3 Coleta de dados

4.3.1 Formação da população

As pacientes atendidas no Setor de Obstetrícia de Emergência do HCFMUSP, com quadro clínico sugestivo de GE foram submetidas ao algoritmo preconizado para diagnóstico de GE **(Apêndice B).** Nos casos de confirmação diagnóstica, 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 βhCG sérica, quantidade de líquido livre na pelve e tamanho da massa ectópica avaliados pela ultrassonografia, seguindo o protocolo estabelecido, em 2015, pelo Setor de Obstetrícia de Emergência do HCFMUSP.

As pacientes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. Foi apresentado o Termo de Consentimento livre e Esclarecido **(Apêndice C).**

No período 11 de julho de 2012 a 19 de agosto de 2013, foram atendidas 62 pacientes com o diagnóstico de GE no Setor de Obstetrícia de

Emergência do HCFMUSP. Dentre elas, 37 foram selecionadas para participar do estudo, pois atendiam aos critérios de inclusão propostos.

Das 25 pacientes que não foram selecionadas para participar do estudo, 18 foram tratadas clinicamente de forma expectante, sem a necessidade de intervenção cirúrgica ou medicamentosa, e seis receberam metotrexato. Uma das pacientes não aceitou participar.

Das 37 pacientes incluídas, três foram excluídas posteriormente: duas devido às amostras não apresentarem tecido trofoblástico no exame anatomopatológico e uma, pela impossibilidade de realização da avaliação da expressão de MMPs e TIMPs nas lâminas, totalizando, ao final, 34 pacientes **(Figura 1).**

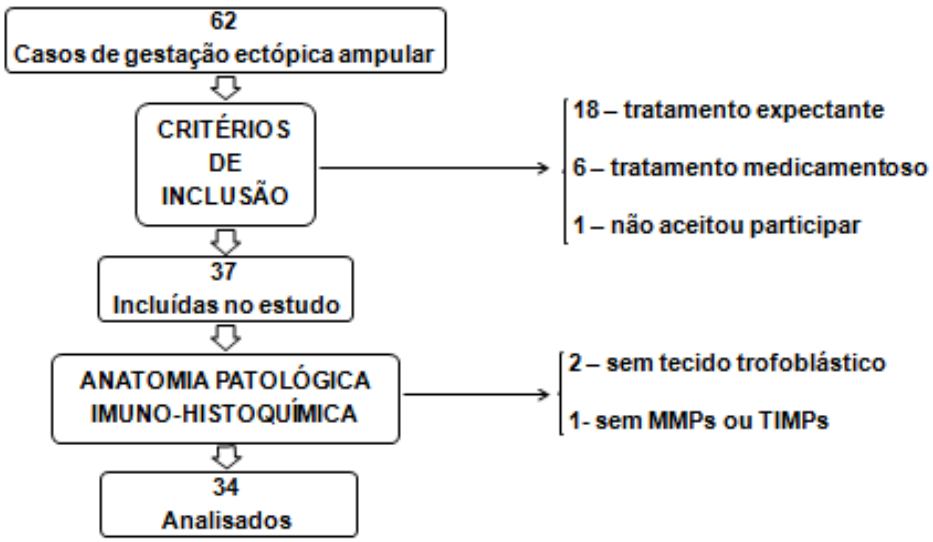


Figura 1 - Fluxograma da formação da população estudada

As características pessoais e obstétricas e os dados clínicos e laboratoriais das 34 pacientes foram coletados utilizando-se formulário específico de coleta de dados, para posterior transferência em banco de dados e análise **(Apêndice D).** As informações obtidas foram: identificação, antecedentes pessoais e obstétricos (paridade, tipo de partos prévios, história prévia de abortamento ou GE), utilização de método contraceptivo, hábitos e exame físico no momento da internação, bem como resultados de exames complementares, tipo de tratamento realizado, localização da GE (diagnóstico cirúrgico) e evolução clínica da paciente. Esses dados foram preenchidos no momento da alta hospitalar e confirmados durante o retorno ambulatorial.

4.3.2 Classificação histopatológica da profundidade da invasão trofoblástica na tuba uterina

Após a realização da cirurgia de salpingectomia, as tubas das 34 pacientes foram encaminhadas, em solução de formalina a 10%, para o Laboratório de Anatomia Patológica do HCFMUSP, para avaliação e classificação quanto à profundidade da invasão trofoblástica, conforme os passos descritos a seguir:

a) avaliação macroscópica e escolha dos fragmentos: determinação da área comprometida, área de dilatação máxima e medidas da tuba uterina;

b) fixação: em uma solução de formalina tamponada a 10%, por 12 horas;

c) desidratação: em cinco banhos em álcool etílico em concentrações crescentes, iniciando com um banho em álcool 70%, seguindo-se um banho em álcool 95%, e terminando com três banhos em álcool absoluto;

d) diafanização: embebição dos fragmentos em três banhos consecutivos de xilol;

e) coloração: inicialmente, foi utilizada a coloração de hematoxilina-eosina e, 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. A coloração imuno-histoquímica para lactogênio placentário humano (hPL) foi realizada para possibilitar a identificação do trofoblasto intermediário e determinar a profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina.

f) impregnação: embebição dos fragmentos em parafina fundida, em estufa a 60 graus Celsius, por uma hora;

g) inclusão: colocação de cada fragmento no molde de parafina fundida;

h) secção seriada em cortes com espessura média de três micrômetros e montagem com lamínula e resina;

i) avaliação microscópica: de, em média, dez cortes corados de cada tuba, por uma única médica patologista, cega em relação às características clínicas das pacientes, por meio do microscópio óptico Nikon E-200 (*Nikon Corporation*, Japão);

j) marcação: com caneta específica, foi delimitada, em cada lâmina, a área de maior invasão trofoblástica, sob visão microscópica.

Algumas lâminas foram preparadas sem o processo de coloração descrito acima (lâminas “brancas”), para que pudessem ser utilizadas, posteriormente, pelo Laboratório de Imuno-histoquímica, pela técnica do DAB (3,3-diaminobenzidina), que permite a identificação dos marcadores (descrita a seguir).

A profundidade de invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina foi classificada adotando critérios estabelecidos por Natale et al., de 2003:

- grau I: infiltração trofoblástica limitada à camada mucosa da tuba uterina **(Figura 2)**;
- grau II: infiltração trofoblástica até a camada muscular da tuba uterina **(Figura 3);**
- grau III: infiltração trofoblástica atingindo a camada serosa da tuba uterina **(Figura 4).**

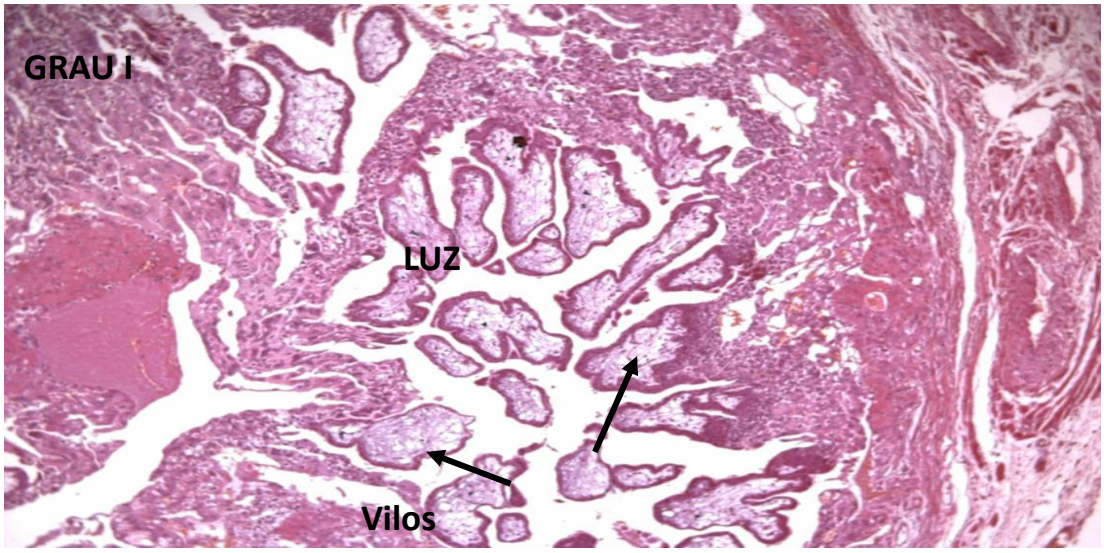


Figura 2 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, com invasão trofoblástica limitada à mucosa, à microscopia óptica. Coloração HE – aumento 50X

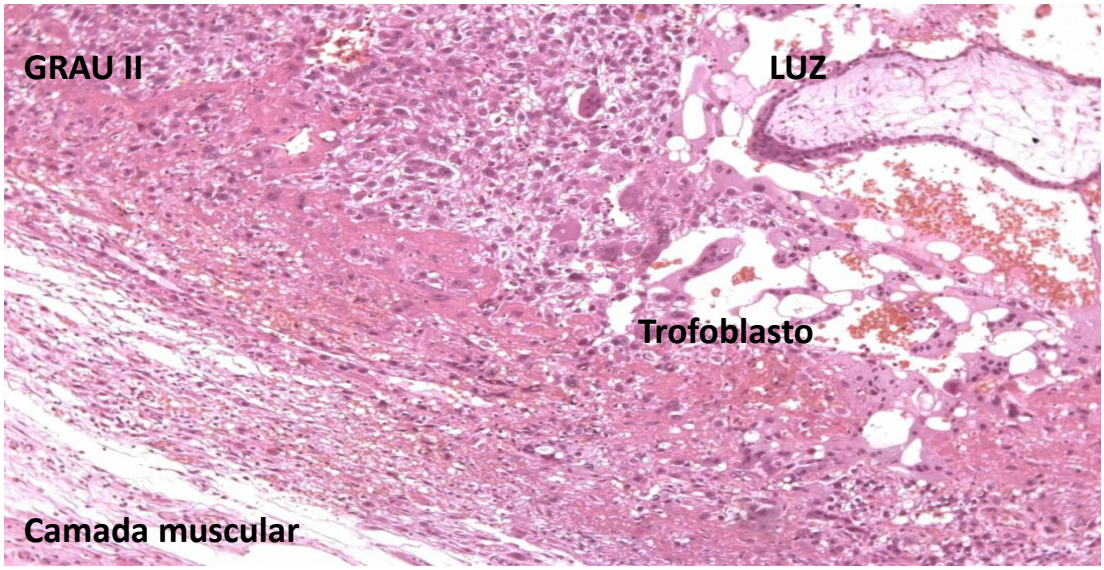


Figura 3 - Imagem histológica de tuba acometida por GE, com invasão trofoblástica limitada à camada muscular, à microscopia óptica. Coloração HE – aumento 50X

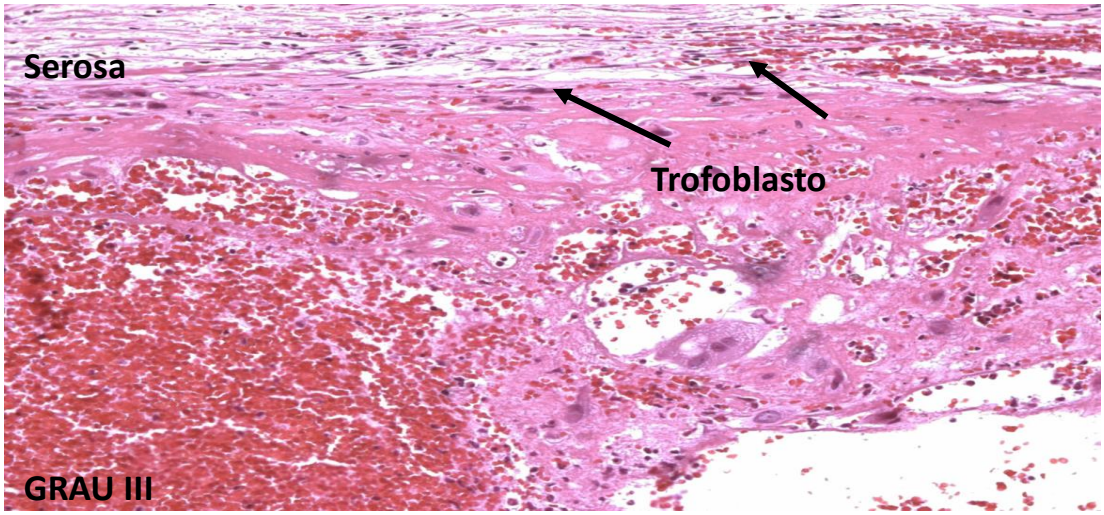


Figura 4 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, envolvendo toda a espessura da parede tubária, à microscopia óptica. Coloração HE – aumento 100X

4.3.3 Avaliação da expressão tecidual das metaloproteinases e seus inibidores no sítio de implantação trofoblástica

No Laboratório de Imuno-histoquímica, utilizando as lâminas "brancas" já confeccionadas, separadas por marcador, para cada paciente, foi realizada a identificação das metaloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-14) e dos inibidores (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3), por meio de técnica imuno-histoquímica (IHQ) indireta, conforme descrição a seguir:

a) desparafinização: as lâminas foram colocadas em xilol quente, em estufa, a 60 graus Celsius, por quatro minutos, passando, em seguida, em três banhos de xilol em temperatura ambiente;

b) hidratação: em banhos de álcool etílico em concentrações decrescentes, iniciando com dois banhos em álcool absoluto,

seguindo-se um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e, finalmente, um banho em ácido fórmico, por três minutos. Segue-se a lavagem com água corrente e água destilada;

c) digestão ou recuperação antigênica: colocação das lâminas em soluções-tampão: de citrato 10mM, EDTA e Tris-EDTA, em panela de pressão Pascal, até atingir 125 graus Celsius, por um minuto, e de tripsina, em estufa, a 38 graus Celsius, por 20 minutos. Segue-se novamente a lavagem em água corrente;

d) bloqueio da peroxidase endógena: colocação das lâminas em água oxigenada 10 volumes (3%) durante cinco minutos, por quatro vezes, seguindo-se a lavagem das lâminas em água corrente e a lavagem em PBS (solução tampão fosfato-alcalino), por três minutos;

e) incubação com os anticorpos: aplicação dos anticorpos primários específicos (designados abaixo) sobre as lâminas, após sua diluição em diluente comercial, e incubação em câmara úmida em geladeira "*overnight*", por 18 a 20 horas. Em seguida, nova lavagem em PBS, por três minutos, para incubação com anticorpos secundários biotinilados complexos *(Novolink Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd*), também em câmara úmida, a 37 graus Celsius, por 30 minutos;

f) coloração: colocação das lâminas em solução de cromógeno DAB (*Sigma Chemical Corporation*, St Louis, Missouri, EUA), por cinco minutos, e lavagem em água corrente;

g) contracoloração: aplicação de hematoxilina de Harris (*Merck*, Alemanha), por cerca de um minuto, seguindo-se nova lavagem em água corrente, por cinco minutos;

h) desidratação em álcool e diafanização em xilol, conforme técnica descrita acima, e montagem com lamínula e resina.

Foi confeccionada uma lâmina para cada marcador, para cada um dos 34 casos.

As especificações dos anticorpos primários (*Abcam*, Cambridge, Inglaterra) utilizados estão descritas a seguir:

- anti-MMP-2 (6E3F8): anticorpo monoclonal (IgG2a), produzido em camundongos, na diluição 1:500.
- anti-MMP-9 (EP1254): anticorpo monoclonal (IgG), produzido em coelhos, na diluição 1:250.
- anti-MMP-14 (EP1264Y): anticorpo monoclonal (IgG), produzido em coelhos, na diluição 1:250.
- anti-TIMP-1 (EPR1550): anticorpo monoclonal (IgG), produzido em coelhos, na diluição 1:500.
- anti-TIMP-2 (6E3F8): anticorpo monoclonal (IgG2a), produzido em camundongos, na diluição 1:400.
- anti-TIMP-3 (6E3F8): anticorpo monoclonal (IgG2a), produzido em camundongos, na diluição 1:400.

As lâminas HE marcadas previamente foram utilizadas como guia para a marcação das lâminas IHQ. Em cada uma delas, a região correspondente à maior invasão do tecido trofoblástico foi delimitada, com

caneta específica. Uma lâmina recebeu, excepcionalmente, duas marcações (para a MMP-9).

No Laboratório de Investigação Médica 57 (LIM-57), foi realizada a análise propriamente dita. A intensidade da expressão de cada marcador foi caracterizada, inicialmente, de maneira qualitativa, em uma escala “em cruzes”, subjetivamente, como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++). Essa classificação foi realizada por duas observadoras independentes, alheias à condição clínica de cada paciente.

Posteriormente, foi realizada a mesma análise de intensidade de expressão dos marcadores, porém, de forma quantitativa.

Entretanto, no intervalo de tempo entre as avaliações, houve perda de alguns casos, por quebra das lâminas, ou desgaste da coloração. Dos 34 casos avaliados inicialmente, de forma quantitativa, três deles não puderam ter nenhum de seus marcadores avaliados na segunda etapa. Ainda, houve perda de alguns casos isolados para determinados marcadores: para a avaliação da MMP-9, foram perdidos dois casos; e para a MMP-14, três. Para a avaliação da TIMP-1, apenas um caso foi perdido; já para a TIMP-2 e para a TIMP-3, lâminas de quatro pacientes, de cada marcador, não puderam ser incluídas. Para a avaliação da MMP-2, não houve perda.

Dessa forma, foram estudados, quantitativamente, 31 casos, em 171 lâminas, correspondendo a 172 áreas marcadas.

Para se obter a avaliação quantitativa da expressão dos marcadores, utilizou-se o microscópio Leica (*Leica Biosystems*, Alemanha) e o programa de aquisição de imagem LAS (*Leica Biosystems*, Alemanha)**.** Foram

digitalizados de um a quatro campos histológicos, em aumentos de 10x e/ou 20x na lente objetiva, de cada uma das áreas previamente marcadas. No total, foram adquiridas 596 imagens, assim distribuídas: 120 da MMP-2, 97 da MMP-9, 84 da MMP-14, 100 do TIMP-1, 87 do TIMP-2 e 108 do TIMP-3.

A quantificação propriamente dita foi possível por meio da utilização do programa ImageJ versão 1.50i (NIH, Maryland, EUA). Nele, há uma função "filtro de deconvolução", que permite "separar" as colorações da imagem original, possibilitando destacar o cromógeno DAB da contracoloração da HE **(Figuras 5, 6 e 7).** No programa, um pixel de imagem digitalizada corresponde a 0,168 484µm, em aumento final de 400x. Para cada imagem, dividindo-se o valor da área marcada pelo DAB pelo valor da área total digitalizada, e multiplicando-se o resultado por cem, obteve-se uma porcentagem de área corada, para cada um dos marcadores.

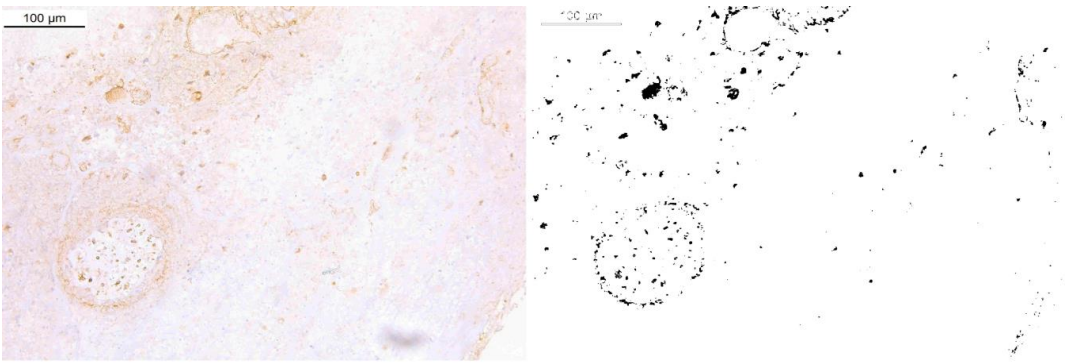


Figura 5 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão fraca da MMP-14, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x

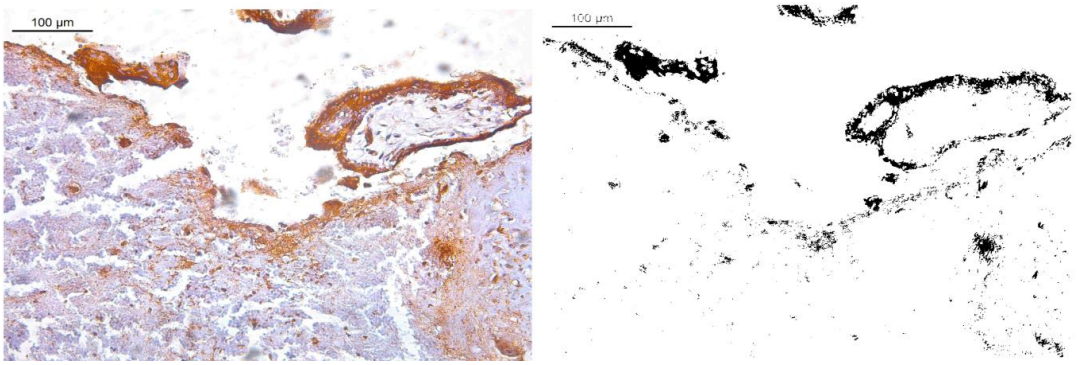


Figura 6 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão moderada do TIMP-2, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x

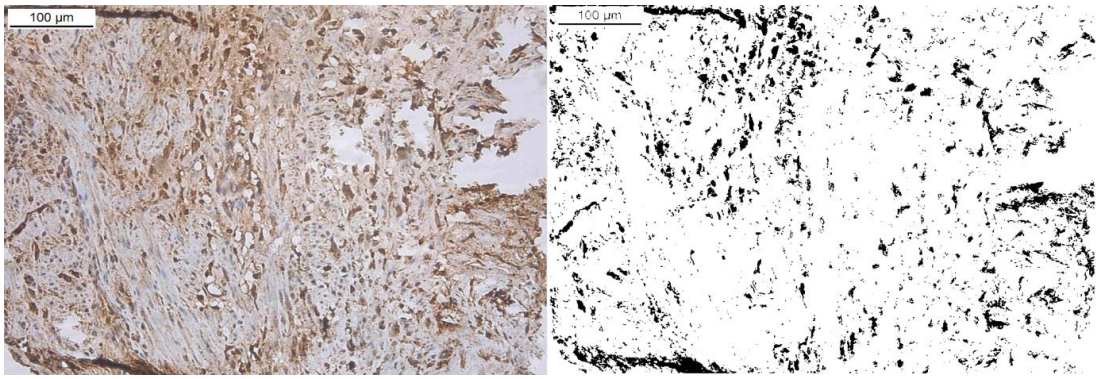


Figura 7 - Imagem histológica de tuba uterina acometida por GE, demonstrando expressão forte da MMP-2, observada à microscopia óptica, antes e depois da aplicação da função "filtro de deconvolução", pelo programa ImageJ – Coloração imuno-histoquímica – aumento 20x

Todos os dados foram tabulados em uma planilha de Excel para posterior análise estatística.

4.3.4 Constituição dos grupos

Os casos foram divididos em três grupos de acordo com a classificação histológica da profundidade de invasão trofoblástica descrita anteriormente, expressa em algarismos romanos:

- grau I
- grau II
- grau III.

4.4 Variáveis analisadas

A expressão das metaloproteinases e de seus inibidores, no sítio de implantação trofoblástica, foi analisada qualitativamente, transformando-se a escala de cruzes em números cardinais, em algarismos arábicos: 0 (-= ausente),1 (+= fraca), 2 (++= moderada) e 3 (+++= forte), e quantitativamente, em porcentagens.

Para a análise qualitativa, foram estudadas e comparadas as expressões dos marcadores separadamente, na população geral do estudo e em subpopulações que agrupavam os graus de invasão (graus I e II associados e grau III isolado; grau I isolado e graus II e III associados), buscando possíveis diferenças, visto que a classificação em grupos era, até esse momento, definida subjetivamente. Para isso, utilizou-se como parâmetro, arbitrariamente, a frequência das expressões moderada (++) ou forte (+++) de cada marcador.

Ainda, na análise quantitativa, foram estudadas as razões entre as expressões de cada marcador e cada inibidor, visando avaliar possível desbalanço entre metaloproteinases e inibidores como possível definidor da profundidade da invasão trofoblástica.

4.5 Análise dos dados

Foram utilizados os softwares Microsoft Excel versão 2010, para a construção do banco de dados, e IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM corp., Armonk, NY), para os cálculos estatísticos.

Variáveis numéricas com distribuição normal foram descritas quanto a sua média e desvio-padrão, e a diferença entre os grupos específicos foi avaliada pelo teste ANOVA ou teste t de Student (quando comparadas duas categorias). Quando o teste ANOVA mostrou significância, o Teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar os pares em que houve a diferença.

Variáveis com distribuição não normal foram descritas pelos valores de mediana, mínimo e máximo, e a comparação entre os grupos do estudo foi realizada pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney (quando comparadas duas categorias).

As variáveis categóricas foram apresentadas pelas frequências absolutas e relativas. A comparação entre as proporções foi avaliada por meio do teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado foi 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

Foram avaliadas 34 pacientes. A idade média foi 29,76 anos, com desvio-padrão de 6,71 anos. A idade gestacional média foi de 8,25 semanas, com desvio-padrão de 2,18 semanas.

A **Tabela 1** apresenta a distribuição da população em relação às características de cor, paridade, estado civil, escolaridade, via de acesso cirúrgico e antecedente de gestação ectópica. Quatro pacientes (11,8%) tinham o antecedente de GE. Em relação à via de acesso cirúrgico, a maioria foi submetida à laparotomia (67,5%); o restante foi operado por via laparoscópica.

Tabela 1 - Características da população (n= 34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

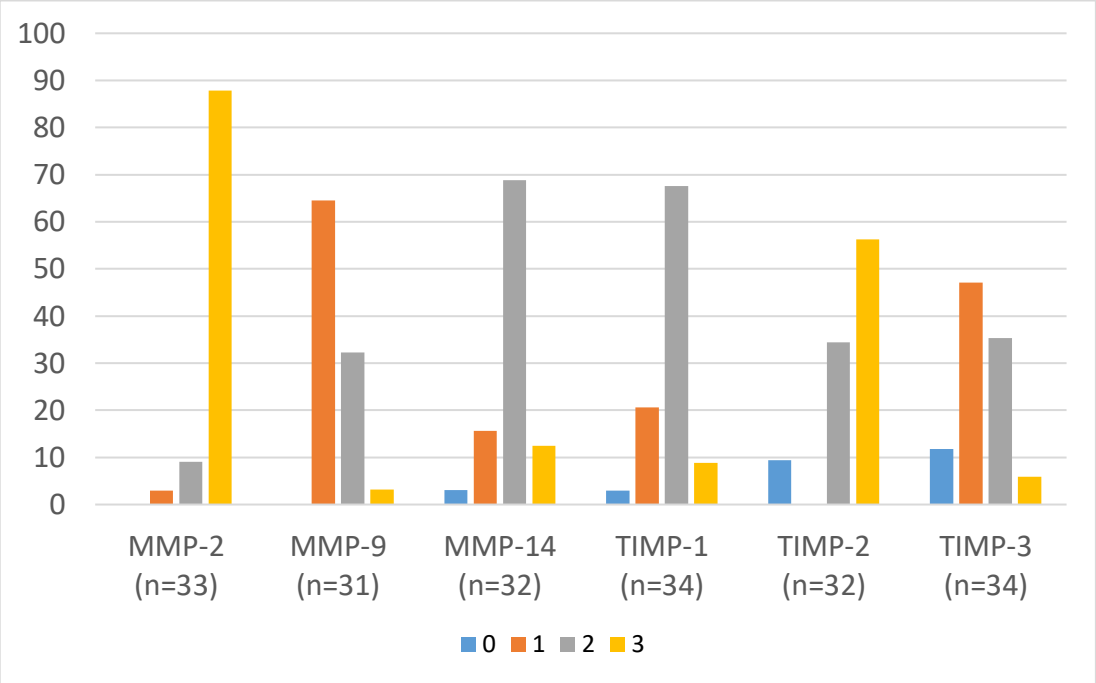
Característica	**n(%)**
Cor	
Branca	23 (67,6)
Não branca	11 (32,4)
Primigesta	
Sim	8 (23,5)
Não	26 (76,5)
Estado civil	
Solteira	20 (58,8)
Casada/amasiada	12 (35,3)
Não declararam	2 (5,9)
Escolaridade – 2º. Grau Completo	
Sim	24 (70,6)
Não	5 (14,7)
Não declararam	5 (14,7)
Via de acesso	
Laparotomia	23 (67,5)
Laparoscopia	11 (32,4)
Antecedente de GE	
Sim	4 (11,8)
Não	30 (78,2)

5.2 Análise qualitativa

Para a análise qualitativa, na avaliação histológica, oito pacientes apresentaram invasão trofoblástica grau I (23,53%), sete, grau II (20,59%) e dezenove, grau III (55,88%).

A frequência de intensidade de expressão de cada marcador e o número total de lâminas consideradas estão ilustradas no **Gráfico 1**, e em tabelas, nos **Anexos 1 e 2**. Como determinados marcadores não puderam ser avaliados em algumas lâminas específicas, o número total, para alguns deles, pode ser inferior a 34.

Gráfico 1 - Porcentagens das expressões qualitativas (0: ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: forte) de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013



Na avaliação qualitativa, a MMP-2 e a MMP-9 apresentaram expressões em todas as lâminas.

A MMP-2 apresentou expressão forte, na vasta maioria das lâminas (87,9%).

O TIMP-2 apresentou expressão forte em pouco mais de metade das lâminas (56,3%), e a maior parte do restante (34,4%) apresentou expressão moderada.

A MMP-14 e o TIMP-1 apresentaram padrão de expressão semelhante, inclusive em porcentagens de lâminas com expressão moderada e ausente.

O TIMP-3 e a MMP-9 foram os marcadores para os quais predominaram as expressões fraca ou moderada.

Após a avaliação das intensidades de expressão dos marcadores, elas foram estudadas em relação ao grau de invasão trofoblástica.

Quando avaliada a expressão da MMP-2 em relação aos graus de invasão trofoblástica, não houve diferença significativa (p= 0,554). De forma concordante ao observado na avaliação global, a MMP-2 expressou-se de forma intensa em todos os graus de invasão, inclusive em proporções muito semelhantes **(Tabela 2).**

Tabela 2 - Expressões qualitativas da MMP-2, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=33) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão da MMP-2**		
		1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	7	0	1 (14,3)	6 (85,7)
II - Muscular	7	1 (14,3)	0	6 (85,7)
III - Serosa	19	0	2 (10,5)	17 (89,5)
Total	33	1 (3,0)	3 (9,1)	29 (87,9)

p= 0,554 (Teste exato de Fisher)

A expressão da MMP-9 apresentou diferença significativa (p= 0,039) entre os diferentes graus de invasão trofoblástica, observando-se relação inversamente proporcional **(Tabela 3).**

Tabela 3 - Expressões qualitativas da MMP-9, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=31) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão da MMP-9**		
		1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	6	2 (33,3)	4 (66,7)	0
II - Muscular	7	6 (85,7)	0	1 (14,3)
III - Serosa	18	12 (66,7)	6 (33,3)	0
Total	31	20 (64,5)	10 (32,3)	1 (3,2)

p= 0,039 (Teste exato de Fisher)

Em relação à expressão da MMP-14, não houve diferença significativa (p= 0,135) entre os graus de invasão, apesar de ser observada porcentagem amplamente maior de expressão moderada **(Tabela 4).**

Tabela 4 - Expressões qualitativas da MMP-14, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=32) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão da MMP-14**			
		0 - Ausente n (%)	1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	6	0	0	6 (100)	0
II - Muscular	7	1 (14,3)	0	4 (57,1)	2 (28,6)
III - Serosa	19	0	5 (26,3)	12 (63,2)	2 (10,5)
Total	32	1 (3,1)	5 (15,6)	22 (68,8)	4 (12,5)

p= 0,135 (Teste exato de Fisher)

Também não foi observada diferença significativa (p= 0,247) entre a expressão do TIMP-1, em relação aos graus de invasão trofoblástica, com a expressão moderada predominando em todos os graus de invasão **(Tabela 5).**

Tabela 5 - Expressões qualitativas do TIMP-1, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão do TIMP-1**			
		0 - Ausente n (%)	1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	8	1 (12,5)	0	7 (87,5)	0
II - Muscular	7	0	1 (14,3)	5 (71,4)	1 (14,3)
III - Serosa	19	0	6 (31,6)	11 (57,9)	2 (10,5)
Total	34	1 (2,9)	7 (20,6)	23 (67,6)	3 (8,8)

p= 0,247 (Teste exato de Fisher)

A expressão do TIMP-2 apresentou diferença significativa (p= 0,035). Houve associação positiva entre a expressão do TIMP-2 e os graus de invasão trofoblástica **(Tabela 6).**

Tabela 6 - Expressões qualitativas do TIMP-2, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=32) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão do TIMP-2**			
		0 - Ausente n (%)	1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	7	2 (28,6)	0	4 (57,1)	1 (14,3)
II - Muscular	7	1 (14,3)	0	2 (28,6)	4 (57,1)
III - Serosa	18	0	0	5 (27,8)	13 (72,2)
Total	32	3 (9,4)	0	11 (34,4)	18 (56,3)

p= 0,035 (Teste exato de Fisher)

Não foi observada diferença significativa (p= 0,116) entre a expressão do TIMP-3 em relação aos graus de invasão trofoblástica **(Tabela 7).**

Tabela 7 - Expressões qualitativas do TIMP-3, em relação aos graus de invasão trofoblástica, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares (n=34) – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Grau de invasão	n	**Expressão do TIMP-3**			
		0 - Ausente n (%)	1 - Fraca n (%)	2 - Moderada n (%)	3 - Forte n (%)
I - Mucosa	8	0	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)
II - Muscular	7	0	4 (57,1)	3 (42,9)	0
III - Serosa	19	4 (21,1)	7 (36,8)	8 (42,1)	0
Total	34	4 (11,8)	16 (47,1)	12 (35,3)	2 (5,9)

p= 0,116 (Teste exato de Fisher)

Com o objetivo de identificar qual é o marcador de maior expressão no sítio de implantação, foram comparadas as frequências de expressão moderada ou forte, de cada metaloproteinase e cada inibidor, para a população geral do estudo e para os graus de invasão isolados e associados. A escolha dos graus de expressão moderado ou forte foi feita arbitrariamente, visto que a comparação entre os marcadores não seria possível sem que se atribuísse peso aos graus de invasão **(Tabela 8).**

Tabela 8 - Porcentagens das expressões moderada (++) ou forte (+++) de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares, na população geral do estudo e nas subpopulações selecionadas – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Marcador	**População**					
	Invasão I, II e III	Invasão I	Invasão II	Invasão III	Invasão I e II	Invasão II e III
MMP-2	97	92	85,7	100	92	96,2
MMP-9	35,5	38,5	14,3	33,3	38,5	28
MMP-14	81,3	92,3	85,7	73,7	92,3	76,9
TIMP-1	76,4	86,7	85,7	68,4	86,7	73,1
TIMP-2	90,7	78,6	85,7	100	78,6	96
TIMP-3	41,2	40	42,9	42,1	40	84,6

5.3 Análise quantitativa

A população total para a análise quantitativa foi de 31 pacientes, sendo sete com grau de invasão I (22,58%), seis com grau de invasão II (19,35%), e dezoito com grau de invasão III (58,06%).

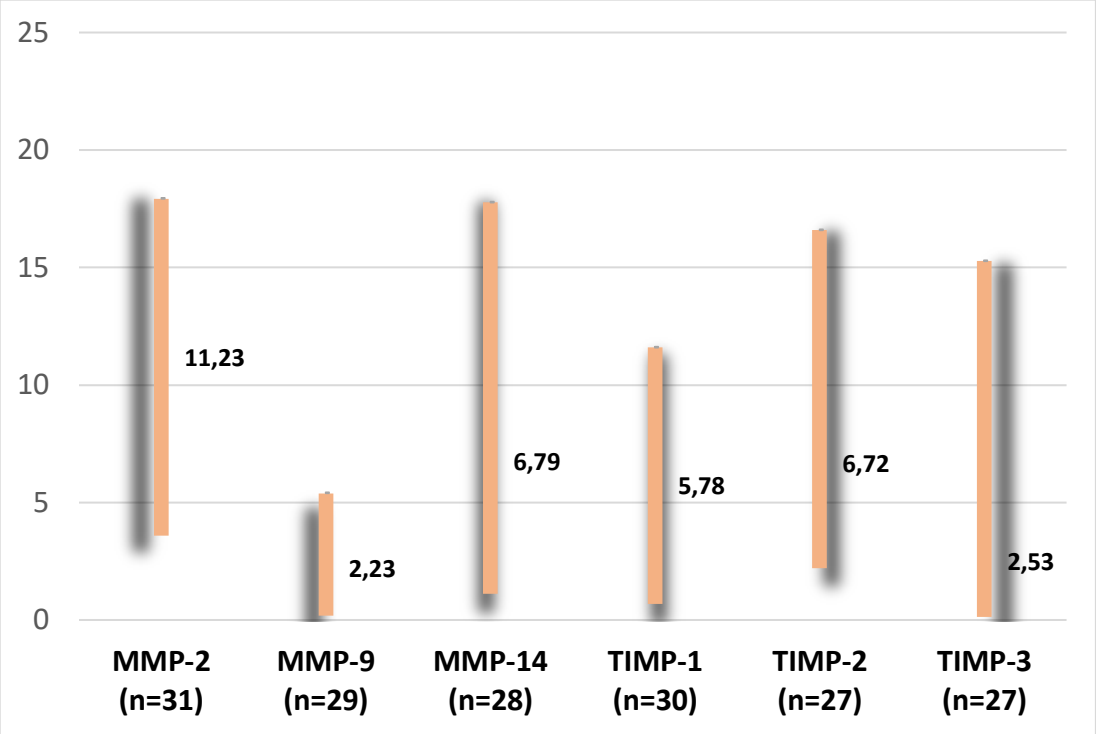
Diferentemente do que ocorreu na análise qualitativa, nesse momento da pesquisa, já foi possível definir qual marcador teve maior ou menor expressão, quando considerada a população total.

Ao avaliar as médias das porcentagens de campos corados, em relação aos campos totais da imagem digitalizada, observou-se que a MMP-9 e o TIMP-3 não apresentaram distribuição normal.

Assim, dentre os marcadores com distribuição normal, a MMP-2 foi o de maior expressão (11,23%; 3,58 – 19,52), seguindo-se a MMP-14 (6,79%; 1,12 – 17,77), o TIMP-2 (6,72%; 2,21 – 16,59) e o TIMP-1 (5,78%; 0,69 – 11,60).

As medianas, mínimos e máximos das expressões dos marcadores, avaliadas em porcentagens de campos corados em relação aos campos totais da imagem, assim como o número de lâminas em cada caso, encontram-se no **Gráfico 2**.

Gráfico 2 - Distribuição das porcentagens das expressões quantitativas de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013



Comparando a expressão dos marcadores entre todos os graus de invasão, a única diferença significativa encontrada foi da expressão da MMP-2 (p= 0,027). Para todos os outros marcadores, não houve diferença significativa **(Tabela 9).**

Tabela 9 - Porcentagens das expressões quantitativas de cada metaloproteinase e cada inibidor, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares, em relação aos graus de invasão trofoblástica – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Marcador (número de lâminas)	**Grau de invasão**			
	I - Mucosa	II – Muscular	III - Serosa	P
MMP-2 (n= 31)	13,39 (10,19 – 17,37)	7,87 (3,58 – 3,55)	10,70 (3,64 – 17,89)	0,027 *
MMP-9 (n=29)	3,07 (0,80 – 5,39)	1,22 (0,11 – 5,29)	1,74 (0,74 – 6,69)	0,366 **
MMP-14 (n= 28)	7,36 (1,12- 17,76)	4,86 (1,69 – 14,99)	1,17 (2,04 – 12,04)	0,679 *
TIMP-1 (n= 30)	5,89 (3,83 – 11,25)	6,36 (2,57 – 11,20)	4,66 (0,70 – 12,04)	0,341 *
TIMP-2 (n= 27)	9,81 (3,78 – 11,84)	5,94 (2,68 – 11,80)	5,52 (2,21 – 16,59)	0,514 *
TIMP-3 (n= 27)	3,14 (0,47 – 15,06)	1,67 (0,18 – 4,84)	1,14 (0,13 – 6,16)	0,398 **

* *ANOVA*

** *Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis*

Isso ocorreu devido à diferença observada entre as expressões na comparação do grau I com o grau II (p= 0,024). Comparando o grau I com o grau III, e o grau II com o grau III, não houve diferença significativa entre as medianas das expressões da MMP-2 (p= 0,362 e p= 0,224, respectivamente) **(Tabela 10).**

Tabela 10 - Comparação entre as porcentagens de expressões quantitativas da MMP-2 e os graus de invasão trofoblástica, agrupados dois a dois, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

	Grupos *	**p**
MMP-2 (n=31)	I *vs*. II **	0,024
	I *vs*. III **	0,362
	II *vs*. III **	0,224

** Grau I= mucosa; Grau II= muscular; Grau III= serosa.*

*** Teste de Bonferroni*

Finalmente, ao se avaliar a razão das médias e das medianas das expressões quantitativas dos marcadores e dos inibidores, separadamente, não foi observada diferença significativa entre os graus de invasão trofoblástica, para nenhuma das associações. Os resultados da comparação com a razão entre a MMP-2 e os inibidores, podem ser observados na **Tabela 11**. Entre a MMP-9 e os inibidores, na **Tabela 12**, e entre a MMP-14 e os inibidores, na **Tabela 13**.

Tabela 11 - Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-2 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Marcadores	Grau de invasão	Média (DP)	p*	Mediana (mínimo-máximo)	p*
MMP-2 / TIMP-1	I	2,36 (0,92)	0,083	2,41 (1,03 – 3,86)	0,116
	II	1,68 (1,83)		1,83 (0,38 – 6,05)	
	III	3,23 (2,87)		3,29 (0,80 – 12,08)	
MMP-2 / TIMP-2	I	1,85 (1,25)	0,654	2,04 (1,11 – 4,75)	0,659
	II	1,77 (1,53)		1,86 (0,40 – 5,16)	
	III	2,09 (1,34)		2,09 (0,60 – 6,25)	
MMP-2 / TIMP-3	I	13,19 (13,53)	0,760	15,09 (1,11 – 42,86)	0,755
	II	18,95 (29,10)		23,85 (1,84 – 99,37)	
	III	16,18 (19,86)		17,83 (1,61 – 74,10)	

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis*

Tabela 12 - Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-9 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Marcadores	Grau de invasão	Média (DP)	p*	Mediana (mínimo-máximo)	p*
MMP-9 / TIMP-1	I	0,39 (0,20)	0,153	0,39 (0,11 – 0,73)	0,197
	II	0,27 (0,24)		0,26 (0,02 – 0,52)	
	III	0,65 (0,58)		0,62 (0,10 – 2,51)	
MMP-9 / TIMP-2	I	0,34 (0,13)	0,847	0,34 (0,20 – 0,51)	0,853
	II	0,30 (0,21)		0,29 (0,01 – 0,55)	
	III	0,43 (0,32)		0,39 (0,07 – 0,97)	
MMP-9 / TIMP-3	I	3,32 (4,50)	0,658	3,62 (0,18 – 12,92)	0,814
	II	2,03 (3,22)		2,15 (0,49 – 8,35)	
	III	4,65 (7,50)		4,51 (0,19 – 22,95)	

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis*

Tabela 13 - Comparação das razões entre as expressões quantitativas da MMP-14 e os inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 com os graus de invasão, nas lâminas de tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Marcadores	Grau de invasão	Média (DP)	p*	Mediana (mínimo-máximo)	p*
MMP-14 / TIMP-1	I	1,50 (1,64)	0,515	1,49 (0,11 – 4,63)	0,522
	II	1,07 (0,69)		1,09 (0,37 – 2,14)	
	III	1,72 (1,62)		1,76 (0,40 – 7,01)	
MMP-14 / TIMP-2	I	0,79 (0,48)	0,580	0,77 (0,12 – 1,24)	0,567
	II	1,05 (0,67)		1,06 (0,17 – 1,91)	
	III	1,42 (1,30)		1,49 (0,23 – 5,46)	
MMP-14 / TIMP-3	I	6,53 (8,02)	0,749	6,88 (0,22 – 21,78)	0,642
	II	7,02 (3,91)		7,41 (2,58 – 12,15)	
	III	12,24 (19,77)		14,37 (0,61 – 63,72)	

** Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis*

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Achados Principais

As metaloproteinases e seus inibidores participam de diversos processos fisiológicos e patológicos relacionados à degradação, remodelação e lesão tecidual. Baseando-se nisso, buscou-se estudar se poderiam exercer esse papel também nas GEs, que têm como característica definidora de sua gravidade, o grau de invasão.

Os achados do presente estudo demonstram que há expressão das metaloproteinases e dos inibidores estudados no sítio de implantação trofoblástica nas gestações ectópicas ampulares; entretanto, não há uniformidade de expressão isolada, ou da razão metaloproteinase / inibidor, em relação aos graus de invasão trofoblástica.

O resultado das avaliações qualitativa e quantitativa das expressões das MMPs e TIMPs foi bastante compatível. A primeira mostrou-se tão adequada quanto a segunda para a análise da expressão dos marcadores por meio da técnica da imuno-histoquímica. As duas abordagens confirmaram que as MMPs -2, -9 e -14 e os TIMPs -1, -2 e -3 estão presentes no sítio de implantação trofoblástica nos tipos de GE estudadas. Ainda que de formas variáveis, foram observadas expressões de todos os marcadores, em todos os graus de invasão.

A MMP-2 foi o marcador que apresentou a maior expressão tecidual local tanto na análise qualitativa, quanto na quantitativa. O TIMP-2 e a MMP-14 seguiram-se como o segundo e o terceiro marcadores mais expressos. Esses resultados fortalecem ainda mais a hipótese da importância do equilíbrio MMP / TIMP, visto que, sabidamente, estão intimamente relacionados à MMP-2, como inibidor e ativador, respectivamente. Por outro lado, é interessante observar que a MMP-9, cuja função e estrutura assemelham-se às da MMP-2, não tenha se destacado.

As proteases escolhidas para o estudo apresentaram expressões bastante uniformes entre os graus de invasão. Assim, a hipótese de que uma maior expressão de MMPs resultaria em invasões mais profundas não se confirmou; de forma semelhante, uma maior expressão de TIMPs não se associou a invasões mais superficiais. É curioso o fato de ter sido observada diferença significativa para a MMP-9 e para o TIMP-2 isolados, quando comparados aos graus de invasão trofoblástica, mas com resultado inverso ao esperado. Mesmo quando foram agrupados os graus de invasão, de forma a classificá-la apenas como superficial ou profunda (graus I e II *versus* III, grau I *versus* II e III), não foi observada a correlação esperada entre as expressões dos marcadores e a penetração trofoblástica, com resultados opostos aos esperados para alguns marcadores também nessa análise.

É relevante ressaltar que os padrões de expressão entre a MMP-2 e o TIMP-2, entre a MMP-14 e o TIMP-1 e entre a MMP-9 e o TIMP-3 foram muito semelhantes. Sabe-se que existe alguma relação entre praticamente todas as MMPs e todos os TIMPs (Olson et al., 1997; Lindsay; Zamilpa,

2012) e é possível que, na situação específica da GE, as expressões dessas duplas de marcadores estejam associadas de forma particular. A partir daí, foram avaliadas todas as relações MMP / TIMP possíveis, mas nenhuma dupla de marcadores apresentou razão com diferença significativa quando comparada aos graus de invasão. Mesmo quando foi realizada a avaliação da relação MMP-2 / TIMP-2, MMP-14 / TIMP-1 e MMP-9 / TIMP-3, não foi observada nenhuma associação com a profundidade de invasão trofoblástica. Não foram avaliadas as razões das MMPs entre si e dos TIMPs entre si, mas alguns autores sugerem que esse poderia ser um caminho para a compreensão da patogênese das doenças relacionadas a alterações no mecanismo de invasão placentária. No estudo de Feng et al. (2017), a MMP-2 e o MMP-9 plasmáticas, isoladamente, não exibiram quaisquer diferenças entre gestações normais e aquelas complicadas com pré-eclâmpsia, mas a proporção MMP-2 / MMP-9 foi significativamente maior nos casos em relação aos controles normais.

6.2 Interpretação dos resultados em relação a estudos publicados

Os resultados deste estudo são parcialmente compatíveis com os publicados anteriormente. A idade gestacional média de oito semanas, associada à maior proporção de casos com invasão tubária profunda, foi ao encontro do observado por Bai et al. (2005), que sugerem que o maior potencial de invasão do trofoblasto, nessa fase, já ocorreu, tendo atingido seu pico entre quatro e oito semanas. Segundo os autores, a redução das

proteínas reguladoras da expressão e secreção de MMPs e TIMPs na MEC, ao redor de oito a nove semanas de gestação, seria responsável por essa característica. Além disso, a observação da expressão de todas as proteases estudadas, sem exceção, no tecido trofoblástico das tubas uterinas com GEs ampulares, é compatível com as de outros autores (Kucera et al., 2000; Qiu et al., 2011).

A expressão majoritária de MMP-2, que ocorreu de forma semelhante para os três graus de invasão, associada a uma expressão também significativa da MMP-14, foi compatível com o estudo de Qiu et al. (2011). No último, entretanto, foi descrita maior expressão da MMP-14 no grau de invasão II em relação ao I, ainda que não tenha sido mencionado o valor da significância estatística. Esses autores avaliaram, separadamente, as porções maternas e fetais da região da implantação tubária e descreveram, também, expressão mais fraca de MMP-9 e TIMP-2 no trofoblasto, em relação aos outros marcadores. Para essa MMP, o achado foi semelhante ao deste estudo, mas para o inibidor, ocorreu o oposto. Apesar dessa diferença, ocorreu em ambos a observação inesperada de expressão crescente desse TIMP em relação à progressão da invasão.

Bai et al. (2005) também estudaram de forma separada as porções maternas e fetais da interface e, igualmente, observaram aumento da expressão do TIMP-1 e do TIMP-2 com o aumento da profundidade da invasão. Porém, os resultados para dois outros marcadores diferiram: a expressão forte da MMP-9, com padrão muito semelhante ao da MMP-2, tanto por imuno-histoquímica quanto por hibridização *in situ*, e a estabilidade

da expressão do TIMP-3 que, neste estudo, cresceu conforme progrediu a invasão.

Kucera et al. (2000), ao contrário, haviam demonstrado expressões de TIMP-2 mais intensas do que de MMP-2, mas os próprios autores salientaram o fato de não terem sido incluídas na avaliação, exclusivamente, GEs ampulares.

6.3 Pontos fortes e limitações

Dentre os estudos cujo objetivo foi avaliar, especificamente, a expressão das MMPs e dos TIMPs nas GEs, este é o de maior casuística, mesmo na avaliação quantitativa, que não contou com os 34 casos selecionados inicialmente.

Ainda, o método aqui utilizado permitiu associar alguns pontos fortes abordados previamente. As expressões dos marcadores já haviam sido avaliadas de forma qualitativa, com base na interpretação de múltiplos observadores (Qiu et al., 2011), e na forma semi-quantitativa, computadorizada (Kucera et al., 2000), mas a associação entre elas não havia sido realizada. O fato de, neste estudo, a análise quantitativa ter confirmado os achados da qualitativa, é bastante relevante, fornecendo embasamento para a utilização dessa técnica, menos dispendiosa em termos financeiros e de tempo.

Ainda assim, o estudo apresenta alguns pontos frágeis, sendo o mais significativo o cálculo do tamanho amostral. Por se tratar de um estudo

secundário, o número de casos corresponde ao do projeto inicial, que não tinha como objetivo primário a avaliação das MMPs e inibidores, mas sim do VEGF sérico e tecidual, em relação aos graus de invasão trofoblástica na tuba. Além disso, houve perda de algumas lâminas devido a quebras ou desgaste da coloração imuno-histoquímica. Ainda assim, se, de fato, houvesse correlação positiva entre a expressão das MMPs e negativa entre a expressão dos TIMPs e a profundidade da invasão, o elevado número de casos com grau de invasão III, que representaram mais de 50% da amostra, teria evidenciado essa associação. A proporção majoritária de casos com grau de invasão III ocorreu, provavelmente, pelo fato de o estudo ter sido desenvolvido em centro de saúde terciário, em que as pacientes chegam com a doença em estágio mais avançado.

Um possível questionamento seria o fato de a avaliação dos marcadores nas lâminas de imuno-histoquímica ter sido realizada bastante tempo após a avaliação dos graus de invasão trofoblástica nas lâminas HE. Entretanto, mesmo que algum desgaste tenha ocorrido, o fato de todas terem sido confeccionadas ao mesmo tempo, e avaliadas simultaneamente, fez com que a amostra permanecesse homogênea em relação a essa exposição.

Ainda, é importante mencionar que este estudo é válido somente para as GEs ampulares, que correspondem à maior parte dos casos (Cunningham et al., 2018; Zugaib, 2019). Devido ao fato de a histologia desta porção ser distinta das demais, com maior relação lúmen/camada muscular (Junqueira; Carneiro, 2017), levando a fisiopatologia também

distinta (Senterman et al., 1988), foram incluídas no estudo apenas as GE comprovadamente localizadas nessa topografia. Além disso, como não foram incluídos casos provenientes de fertilização assistida, não é possível aplicar as conclusões aos casos decorrentes dessas técnicas, pois não se sabe se as medicações e hormônios utilizados poderiam alterar a expressão dessas proteases. Acredita-se que a expressão das MMPs na tuba uterina seja cíclica e associe-se aos níveis de hormônios esteroides (Diaz et al., 2012).

6.4 Aplicações clínicas e de pesquisa

Questiona-se quais condições poderiam afetar significativamente as expressões observadas de MMPs e TIMPs tanto locais quanto circulantes. Sabe-se que são moléculas de difícil identificação em adultos, porém, condições como a lesão tecidual e a gestação aumentam a deposição proteica, facilitando sua observação (Nissi et al., 2013). A maior parte dos estudos descreve a identificação das proteases por meio de técnica de imuno-histoquímica, para os tecidos e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para o plasma. Entretanto, também podem ser utilizadas técnicas de zimografia baseada em gel, para ambas as análises e, mais recentemente, ressonância e tomografia moleculares fluorescentes (Anumba et al., 2010; Iyer et al., 2012; Nissi et al., 2013).

Para que esses marcadores possam ter utilidade prática, são necessários estudos que determinem o melhor método de identificação e

que validem, precisamente, as aferições não apenas de suas expressões teciduais, mas também de suas concentrações séricas e plasmáticas (Gerlach et al., 2009). Gerlach et al., em 2009, encontraram boa correlação entre essas dosagens de MMP-9, MMP-2 e TIMP-2 na hipertensão gestacional. Segundo os autores, tais achados, se usados com cautela, poderiam ser aplicados a outros estudos para interpretação dos dados. Se, de fato, for possível estabelecer alguma correspondência entre as dosagens sanguíneas dessas proteínas e a invasão trofoblástica tubária, estaremos mais próximos de utilizá-las como biomarcadores diagnósticos e prognósticos precisos e não invasivos.

Entretanto, para isso, ainda é necessário comprovar que os níveis circulantes de MMPs refletem de forma fidedigna a expressão dos marcadores no local da implantação. Ainda não há estudos comparando a expressão tecidual das MMPs e TIMPs aos seus níveis séricos ou plasmáticos na gestação, mas essa relação já foi avaliada para algumas condições cuja fisiopatologia assemelha-se ao mecanismo da placentação inicial. Salata et al. (2008) compararam os níveis séricos e teciduais de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em mulheres com endometriose em estágio leve e grave e observaram que as concentrações séricas desses marcadores não podem ser consideradas uma medida válida da gravidade da doença. Em pacientes com tumores do tipo colesteatoma, os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1 foram semelhantes quando comparados aos de pacientes sadios, enquanto os níveis teciduais desses marcadores foram maiores nos tecidos dos portadores da doença do que nos controles

(Olszewska et al., 2016). Os achados são muito relevantes pois sugerem, ao menos até o momento, que não há correlação precisa entre o nível sérico e a expressão dessas proteases nos tecidos, o que seria extremamente limitante para a sua aplicabilidade clínica.

Deve-se considerar também que, mesmo que se assemelhe bastante à nidação na gestação intrauterina, a implantação na GE provavelmente apresenta padrão distinto de expressão de MMPs e TIMPs, devido às particularidades do ambiente tubário. Ainda que alguns estudos não descrevam papel importante dessas proteases no estágio muito inicial da gestação (Christiane et al., 2014), elas já foram identificadas em exossomos derivados do endométrio que participam diretamente no *crosstalk* com o embrião (Latifi et al., 2018). É possível que, nessa fase, eventuais danos tubários levem a uma menor concentração tecidual local de oxigênio, estimulando a produção de MMPs de forma semelhante ao que ocorre na carcinogênese (Mehecha; Wang, 2017) e favorecendo o processo de invasão patológica.

Finalmente, sabe-se que algumas patologias tubárias, como a hidrossalpinge, relacionam-se a baixas taxas de gravidez, no contexto de programas de fertilização *in vitro* e transferência de embriões. Isso sugere interferência direta do ambiente tubário na gestação intrauterina, e é bastante plausível que o contrário também ocorra. As causas ainda não são bem compreendidas, mas acredita-se que expressões anormais de moléculas-chave, como as MMPs, no endométrio, tenham papel relevante nesse momento (Savaris; Giudice, 2007). Talvez, na gestação tubária, a

ocorrência e a gravidade do quadro estejam relacionadas não à expressão local dessas proteinases, mas sim à sua expressão endometrial. Nesse caso, e possível que as respostas para os questionamentos sobre a fisiopatologia molecular da GE não estejam na tuba, mas sim no ambiente intrauterino.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O presente estudo, que avaliou as expressões qualitativas e quantitativas das metaloproteinases (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs) nas gestações tubárias ampulares, e as comparou com a profundidade da invasão trofoblástica, concluiu que:

- houve expressão das metaloproteinases MMP-2, MMP-9 e MMP-14, e dos inibidores de metaloproteinases TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3, no sítio de implantação trofoblástica, nesse tipo de gestação, sendo a MMP-2 o marcador que se expressa com maior intensidade, tanto na análise qualitativa quanto na quantitativa;
- não houve correlação entre a expressão das metaloproteinases e dos inibidores estudados e os graus de invasão trofoblástica.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A – Frequência das expressões (0: ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: forte) de cada metaloproteinases (MMP), em porcentagens, nas tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Expressão	**Marcador**		
	MMP-2 n(%)	MMP-9 n(%)	MMP-14 n(%)
0 - Ausente	0	0	1 (3,1)
1 - Fraca	1 (3,0)	20 (64,5)	5 (15,6)
2 - Moderada	3 (9,1)	10 (32,3)	22 (68,8)
3 - Forte	29 (87,9)	1 (3,2)	4 (12,5)
Total	33 (100)	31(100)	32 (100)

Anexo B – Frequência das expressões (0: ausente, 1: fraca, 2: moderada, 3: forte) de cada inibidor de metaloproteinases (TIMP), em porcentagens, nas tubas com gestações ectópicas ampulares – HCFMUSP – julho de 2012 a agosto de 2013

Expressão	**Marcador**		
	TIMP-1 n(%)	TIMP-2 n(%)	TIMP-3 n(%)
0 - Ausente	1 (2,9)	3 (9,4)	4 (11,8)
1 - Fraca	7 (20,6)	0	16 (47,1)
2 - Moderada	23 (67,6)	11 (34,4)	12 (35,3)
3 - Forte	3 (8,8)	18 (56,3)	2 (5,9)
Total	34 (100)	32 (100)	34 (100)

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- Abbott J, Emmans LS, Lowenstein SR. Ectopic pregnancy: ten common pitfalls in diagnosis. *Am J Emerg Med*. 1990;8:515-22.

- Alkatout I, Honemeyer U, Strauss A, Tinelli A, Malvasi A, Jonat W, Mettler L, Schollmeyer T. Clinical diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 2013;68(8):571.

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Tubal ectopic pregnancy. ACOG Practice Bulletin No. 193. *Obstet Gynecol* 2018;131:e91-103.

- Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R et al. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod.* 2011 Oct;17(10):637-52.

- Anumba DOC, Gelany SEI, Elliott SL, Li TC. Circulating levels of matrix proteases and their inhibitors in pregnant women with and without a history of recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:62.

- Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers - A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.* 2017;76:9.23.1-9.23.17.

- Attar E. Endocrinology of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004;31(4):779.

- Autio-Harmainen H, Hurskainen T, Niskasaari K, Hoyhtya M, Tryggavason K. Simultaneous expression of 70 kilodalton type IV

collagenase and type IV collagen al (IV) chain genes by cells of early human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest*. 1992;67:191-200.

- Bai SX, Wang YL, Qin L, Xiao ZJ, Herva R, Piao YR. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction.* 2005;129(1):103-13.

- Balci M, Özdemir G. Differential Expression of EGFR-1, MMP-3, and MMP-9 in spontaneous abortions, induced abortions, and tubal pregnancies. *Turk Patoloji Derg*. 2019;35(1):1-8.

- Barnhart KT, Sammel MD, Gracia CR, Chittams J, Hummel AC, Shaunik A. Risk factors for ectopic pregnancy in women with symptomatic first-trimester pregnancies. *Fertil Steril.* 2006;86:36-43.

- Barnhart KT. Clinical practice. Ectopic Pregnancy. *N Engl J Med*. 2009;361(4):379-87.

- Barnhart K, Speicher DW. Molecular diagnosis of ectopic pregnancy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(8):759-62.

- Berg CJ, Callaghan WM, Syverson C, Henderson Z. Pregnancy-related mortality in the United States, 1998 to 2005. *Obstet Gynecol.* 2010;116(6):1302.

- Birkedal-Hansen H. From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. *J Oral Pathol*. 1988;17:445-51.

- Bjϕrn SF, Hastrup N, Lund LR. Co-coordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:713-23.

- Bjϕrn SF, Hastrup N, Larsen JN, Lund LR, Pyke C. Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta*. 2000;21(2-3):170-6.

- Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;878:73-91.

- Bouyer J, Coste J, Fernandez H, Pouly JL, Job-Spira N. Sites of ectopic pregnancy: a 10 year population-based study of 1800 cases. *Hum Reprod.* 2002;17(12):3224.

- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1477:267-83.

- Brown DL, Felker RE, Stovall TG, Emerson DS, Ling FW. Serial endovaginal sonography of ectopic pregnancies treated with methotrexate. *Obstet Gynecol*. 1991;77(3):406-9.

- Bruner-Tran KL, Zhang Z, Eisenberg E, Winneker RC, Osteen KG. Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1554-60.

- Budowick M, Johnson TR Jr, Genadry R, Parmley TH, Woodruff JD. The histopathology of the developing tubal ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1980;34(2):169-71.

- Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update.* 1996;2:307-21.

- 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(9):2426-31.

- Cabar FR, Fettback PB, Pereira PP, Zugaib M. Serum markers in the diagnosis of tubal pregnancy*. Clinics.* 2008 Oct;63(5):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(5):1595-600.

- 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*. 2015;103(3):734-7.

- Cabar FR, Teshima DR, Pereira PP, Antonangelo L, Schultz R, Francisco RP. Serum concentration of vascular endothelial growth factor and depth of trophoblastic invasion in ampullary ectopic pregnancy. *Clinics.* 2016; 71(12):699-702.

- Cacciatore B, Stenman UH, Ylöstalo P. Diagnosis of ectopic pregnancy by vaginal ultrasonography in combination with a discriminatory serum hCG level of 1000 IU/l (IRP). *Br J Obstet Gynaecol.* 1990a;97(10):904-8.

- Cacciatore B. Can the status of tubal pregnancy be predicted with transvaginal sonography? A prospective comparison of sonographic, surgical, and serum hCG findings. *Radiology.* 1990b;177(2):481-4.

- Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem*. 1995;270(2):801-5.

- Cartwright J, Duncan WC, Critchley HO, Horne AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: Current candidates and future possibilities. *Reproduction.* 2009;138: 9-22.

- Cauwe B, Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45:351-423.

- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253:269-285.

- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod*. 1994;51(3):524.

- Chen J, Khalil RA. Matrix metalloproteinase in normal pregnancy and preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;148:87-165.

- Chiao YA, Zamilpa R, Lopez EF, Dai Q, Escobar GP, Hakala K, et al. In vivo matrix metalloproteinase-7 substrates identified in the left ventricle post-myocardial infarction using proteomics. *J Proteome Res*. 2010;9:2649-57.

- Christensen B, Schack L, Klaning E, Sorensen ES. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. *J Biol Chem*. 2010;285(11): 7929-37.

- Christiane Y, Emonard V, Emonard H. Involvement of matrix metalloproteinases in obstetrics: from implantation to delivery. *Rev Med Liege.* 2014 Jan;69(1):46-50.

- Creanga AA, Shapiro-Mendoza CK, Bish CL, Zane S, Berg CJ, Callaghan WM. Trends in ectopic pregnancy mortality in the United States: 1980-2007. *Obstet Gynecol*. 2011;117(4):837.

- Creanga AA, Syverson C, Seed K, Callaghan WM. Pregnancy-related mortality in the United States, 2011-2013. *Obstet Gynecol*. 2017;130:366-73.

- Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.

- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Dashe JS, Hoffman BL, Casey MB, et al. *Obstetrícia de Williams*. 24a ed. New York: McGraw-Hill; 2018. p.377 a 395.

- Daniel Y, Geva E, Lerner-Geva L, Eshed-Englender T, Gamzu R, Lessing JB, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with ectopic pregnancy: is this a novel marker? *Fertil Steril.* 1999;72(6):1013-17.

- Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet*. 1997;21:44-54.

- De Cecco L, Capitanio GL, Croce S, Forcucci M, Gerbaldo D, Rissone R. Biology of nidation and ectopic implantation. *Acta Eur Fertil*. 1984;15(5):347-55.

- Dhiman P, Senthilkumar GP, Rajendiran S, Sivaraman K, Soundararaghavan S, Kulandhasamy M. Serum activin B concentration as predictive biomarker for ectopic pregnancy. *Clin Biochem*. 2016;49(7-8):609-12.

- Diaz PS, Solar PA, Juica NE, Orihuela PA, Cardenas H, Christodoulides M, et al. Differential expression of extracellular matrix components in the Fallopian tubes throughout the menstrual cycle. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:56.

- Dietl J, Buchholz F, Kindler PA. Histopathology of tubal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 1988;27(3):385-8.

- Ding F, Zhang QS, Xing FQ. MMP-2/TIMP-2 expression in the trophoblasts of patients with gestational trophoblastic disease. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007;27(2):150-2.

- Dubernard G, Galtier-Fougairolles M, Cortez A, Uzan S, Challier JC. Immunohistochemistry of adhesion molecules, metalloproteinases and NO-syntases in extravillous trophoblast of tubal pregnancy. *Cell Moll Biol (Noisy-le-grand)*. 2005;51 Suppl:OL829-37.

- Elito J Jr, Ferreira DF, Araujo Júnior E, Stavale JN, Camano L. Values of beta-human chorionic gonadotrofin as a risk factor for tubal pregnancy rupture evaluated by histopathology. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27(6):637-9.

- Erol O, Süren D, Karaca M, Sezer C. Ultrasonography for the prediction of extension of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ampullary pregnancy. *Ginekol Pol.* 2015a;86(1):16-20.

- Erol O, Suren D, Unal B, Ozel D, Kumru S, Sezer C. Significance of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ampullary pregnancy. *Int J Surg Pathol*. 2015b;23(4):271-6.

- Felemban A, Sammour A, Tulandi T. Serum vascular endothelial growth factor as a possible marker for early ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2002;17(2):490-2.

- Feng H, Wang L, Zhang M, Zhang Z, Guo W, Wang X. Ratio of matrix metalloproteinase-2 to -9 is a more accurate predictive biomarker in women with suspected pre-eclampsia. *Biosci Rep*. 2017;15:37(2).

- Gerlach RF, Meschiari CA, Marcaccini AM, Palei ACT, Sandrim VC, Cavalli RC et al. Positive correlations between serum and plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9 levels in disease conditions. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(7):888-91.

- Glasser S, Aplin J, Giudice L, Tabibzadeh S. *The endometrium.* Londres: Taylor & Francis; 2002.

- Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod*. 2003;9:367-73.

- Green LK, Kott ML. Histopathologic findings in ectopic tubal pregnancy. *Int J Gynecol Pathol*. 1989;8(3):255-62.

- Hair Jr. JF, Black B, Babin B, Anderson RE, Tatham RL. *Multivariate data analysis*. 6th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2005. p928.

- Hale SA, Weger L, Mandala M, Osol G. Reduced NO signaling during pregnancy attenuates outward uterine artery remodeling by altering MMP expression and collagen and elastin deposition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(4):H1266-75.

- Harris LK. Review: trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel*. Placenta.* 2010;31 Suppl:S93-8.

- Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem*. 2001;276:3203-14.

- Horne AW, Duncan WC, Critchley HO. The need for serum biomarker development for diagnosing and excluding tubal ectopic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010;89(3):299-301.

- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*. 1998;291:133-48.

- Hurskainen T, Höyhtyä M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(12):1379-88.

- Hurskainen T, Seiki M, Apte SS, Syrjäkallio-Ylitalo M, Sorsa T, Oikarinen A, et al. Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) in early human placenta. A possible role in placental implantation? *J Histochem Cytochem.* 1998;46:221-29.

- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999;99(1):81-92.

- Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta.* 2003;24(1):53-64.

- Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, Lindsey ML. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(8):H919-30.

- Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2013;34:981-1023.

- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*: texto e atlas.13a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

- Kayano K, Shimada T, Shinomiya T, Nakai S, Hisa Y, Aoki T, et al. Activation of pro-MMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. *J Pathol*. 2004;202(4):403-411.

- Ke Y, Lu JH, Yang BL, Guo HQ, Ma QY, Shu HM. Involvement of matrix matelloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1,2 in occurrence of accrete placenta. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006;41(5):311-4.

- Kiss H, Klein M, Egarter C, Graf AH, Hacker G, Hütter W et al. Proliferative cell activity in correlation to human chorionic gonadotrophin release of trophoblast tissue of tubal pregnancy. *Hum Reprod.* 1997;12(2): 383-6.

- Klein M, Graf A, Kiss H, Czerwenka K, Beck A, Egarter C et al. The relation between depth of trophoblastic invasion and beta-HCG levels in tubal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 1995;256(2):85-8.

- Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5):891-7.

- Kocarslan S, Incebiyik A, Guldur ME, Ekinci T, Ozardali HI. What is the role of metalloproteinase-2 in placenta percreta? *J Obstet Gynaecol Res*. 2015,41(7):1018-22.

- Kucera E, Tangl S, Klem I, König F, Grossschmidt K, Kainz C, et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 (MMP-1 and MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in ruptured and non-ruptured tubal ectopic pregnancies. *Wien Klin Wochenschr*. 2000;112(17):749-53.

- 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(12): 3231-4.

- Lala PK, Graham CH. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9:369-79.

- 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(3):686-90.

- Latifi Z, Fattahi A, Ranjbaran A, Nejabati HR, Imakawa K. Potential roles of metalloproteinases of endometrium-derivedexosomes in embryo-maternal crosstalk during implantation. *J Cell Physiol.* 2018 Jun;233(6):4530-45.

- Lavee M, Goldman S, Daniel-Spiegel E, Shalev E. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;23;7:85.

- Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc Ther*. 2012;30(1):31-41.

- Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod*. 2008;78(6):1064-72.

- Lovelock JD, Baker AH, Gao F, Dong JF, Bergeron AL, McPheat W, et al. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H461-68.

- Lu Q, Yan Q, Xu F, Li Y, Zhao W, Wu C, et al. Micro-RNA-873 is a potential serum biomarker for the detection of ectopic pregnancy. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(6):2513-22.

- Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays.* 1992;14(7):455-63.

- Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argueso P. Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 14):3141-8.

- Mahecha AM, Wang H. The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and -9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:4617-24.

- Montagnana M, Lippi G, Albiero A, Scevarolli S, Salvagno GL, Franchi M et al. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. *J Clin Lab Anal*. 2009;23(2):88-92.

- Morgan M, Kniss D, McDonell S. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. *Exp Cell Res*. 1998;242:18-26.

- 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.

- Murray H, Baakdah H, Bardell T, Tulandi T. Diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *CMAJ*. 2005;173(8):905.

- Nagase H. A personal journey with matrix metalloproteinases. *Biol. Chem*. 2016;397(9):805-13.

- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-73.

- 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(4):981-6.

- Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, Järvelä I, Turpeenniemi-Hujanen T. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Jan;11:2.

- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta through gestation. *Life Sciences*. 2000;66:1127-37.

- Oktay K, Brzyski RG, Miller EB, Krugman D. Association of serum beta-hCG levels with myosalpingeal invasion and viable trophoblast mass in tubal pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1994;84(5):803-6.

- Olszewska E, Matulka M, Mroczko B, Pryczynicz A, Kemona A, Szmitkowski M. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. *Histol Histopathol*. 2016;31(3):307-15.

- Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Physiol.* 2004;200:2-10.

- Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem*. 1997;272:29975-83.

- Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem*. 2008;41(10-11): 875-80.

- Pauerstein CJ, Croxatto HB, Eddy CA, Ramzy I, Walters MD. Anatomy and pathology of tubal pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1986;67(3):301-8.

- Pereira PP, Cabar FR, Schultz R, Zugaib M. Association between ultrasound findings and extent of trophoblastic invasion into the tubal wall in ampullary pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(4):472-6.

- Qian H, Li X, Zhang W, Ma L, Sun J, Tang X et al. Caspase-10, matrix metalloproteinase-9 and total laminin are correlated with the tumor malignancy of clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;16(2):2039-45.

- Qin X, Garibay-Tubas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1 and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod.* 1997;56:800-11.

- 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(9):966-71.

- Rahat B, Sharma R, Bagga R, Hamid A, Kaur J. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases. *Reproduction*. 2016;152(1):11-22.

- Rajtar-Ciosek A, Wyroba J, Kacalska-Jansen O, Zmaczyński A, Figula J, Babczyk D, et al. Markers of implantation in ectopic and high-risk early eutopic pregnancies. *Folia Med Cracov*. 2016;56(3):41-50.

- Randall S, Buckley CH, Fox H. Placentation in the fallopian tube. *Int J Gynecol Pathol.* 1987;6(2):132-9.

- Raush ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2015;55(2):418-23.

- Revel A, Ophir I, Koler M, Achache H, Prus D. Changing etiology of tubal pregnancy following IVF. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1372-76.

- Salata IM, Stojanovic N, Cajdler-Łuba A, Lewandowski KC, Lewiński A. Gelatinase A (MMP-2), gelatinase B (MMP-9) and their inhibitors (TIMP 1, TIMP-2) in serum of women with endometriosis: Significant correlation between MMP-2, MMP-9 and their inhibitors without difference in levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in relation to the severity of endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(6):326-30.

- Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Me*d. 2007;25(6):476-82.

- Seiki M, Koshikawa N, Yana I. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis*. Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(2-3):129-43.

- Senapati S, Barnhart KT. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1107-16.

- Senapati S, Sammel MD, Butts SF, Takacs P, Chung K, Barnhart KT. Predicting first trimester pregnancy outcome: derivation of a multiple marker test. *Fertil Steril*. 2016;106(7):1725-32.

- Senterman M, Jibodh R, Tulandi T. Histopathologic study of ampullary and isthmic tubal ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;159(4): 939.

- Shao R, Zou S, Wang X, Feng Y, Brännström M, Stener-Victorin E, et al. Revealing the hidden mechanisms of smoke-induced fallopian tubal implantation. *Biol Reprod*. 2012a;86(4):131.

- Shao R, Wang X, Wang W, Stener-Victorin E, Mallard C, Brännström M et al. From mice to women and back again: Causalities and clues for Chlamydia-induced tubal ectopic pregnancy. Fertil Steril. 2012b;98(5):1175-85.

- Shao R, Feng Y, Zou S, Weijdegård B, Wu G, Brännström M, et al. The role of estrogen in the pathophysiology of tubal ectopic pregnancy. *Am J Transl Res*. 2012c;4(3):269-78.

- Shaw JLV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2010; 16(4):432-44.

- Shaw JL, Diamandis EP, Horne AW, Barnhart K, Bourne T, Messinis IE. Ectopic pregnancy. *Clin Chem*. 2012;58(9):1278-85.

- Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta.* 1997;18(8):657.

- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:59.

- Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:56.

- Stock CK. Histopathologic changes in tubal pregnancy. *J Reprod Med*. 1985;30(12):923-8.

- Stock RJ. Tubal pregnancy. Associated histopathology. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1991;18(1):73-94.

- Stulberg DB, Cain LR, Dahlquist I, Lauderdale DS. Ectopic pregnancy rates and racial disparities in the Medicaid population, 2004-2008. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1671.

- Stulberg DB, Cain L, Dahlquist IH, Lauderdale DS. Ectopic pregnancy morbidity and mortality in low-income women, 2004-2008. *Hum Reprod.* 2016;31(3):666.

- Tency I, Verstraelen H, Kroes I, Holtappels G, Verhasselt B, Vaneechoutte M, et al. Imbalances between Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) in Maternal Serum during Preterm Labor. *PLoS One.* 2012;7(11):e49042.

- 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.

- Tochowicz A, Maskos K, Huber R, Oltenfreiter R, Dive V, Yiotakis A. Crystal structures of MMP-9 complexes with five inhibitors: contribution of the flexible Arg424 side-chain to selectivity. *J Mol Biol.* 2007;371(4):989-1006.

- Tyagi SC, Bheemanathini VS, Mandi D, Reddy HK, Voelker DJ. Role of extracellular matrix metalloproteinases in cardiac remodeling. *Heart Fail Rev.* 1996;1:73-80.

- 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(5):1657-61.

- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8):827-39.

- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999;13:781-972.

- Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, et al. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metaloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod*. 2001;65:240-46.

- Yang WC, Chen HW, Au HK, Chang CW, Huang CT, Yen YH et al. Serum and endometrial markers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2):305-18.

- Zavadzkas JA, Mukherjee R, Rivers WT, Patel RK, Meyer EC, Black LE et al. Direct regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase following myocardial infarction causes changes in survival, cardiac function and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1656-66.

- Zhu J, Zhong M, Pang Z, Yu Y. Dysregulated expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors may participate in the pathogenesis of pre-eclampsia and fetal growth restriction. *Early Hum Dev*. 2014;90(10):657-64.

- Zhuang Y, Qian Z, Huang L. Elevated expression levels of matrix metalloproteinase-9 in placental villi and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in decidua are associated with prolonged bleeding after mifepristone-misoprostol medical abortion. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):166-17.

- Zugaib M, Francisco RPV. *Zugaib Obstetrícia*. 4a ed. Barueri: Manole; 2019.

10 Apêndice

Apêndice A

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

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

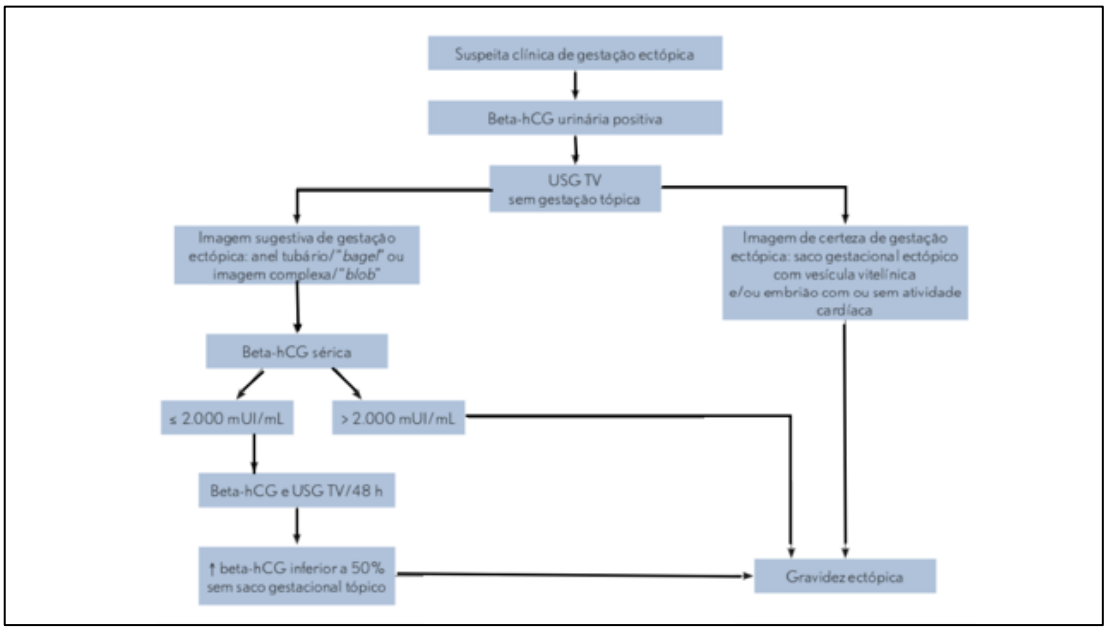
Resumo :

Em virtude de sua elevada incidência, morbidade e mortalidade o estudo da gestação ectópica (GE) representa um importante tema dentro da Obstetrícia 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). sto 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 ß-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, consequente, 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 B


Suspeita clínica de gestação ectópica
Beta-hCG urinária positiva
USG TV
sem gestação tópica
Imagem sugestiva de gestação ectópica: anel tubário/"bagel" ou imagem complexa/"blob"
Imagem de certeza de gestação ectópica: saco gestacional ectópico com vesícula vitelínica e/ou embrião com ou sem atividade cardíaca
Beta-hCG sérica
≤ 2.000 mUI/mL
> 2.000 mUI/mL
Beta-hCG e USG TV/48 h
↑ beta-hCG inferior a 50% sem saco gestacional tópico
Gravidez ectópica

Apêndice C

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
Apêndices
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 beneficio 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.

Apêndices

- 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, semianalfabetos 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 / /

Apêndice D

SETOR DE OBSTETRÍCIA DE EMERGÊNCIA

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 parietocólica 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.

Data				
Hb				
Ht				
Leuco				
Plaquetas				
Progesterona				
βhCG				
VEGF sérico				