FÁBIO ROBERTO CABAR

**Concentração sérica do fator de crescimento vascular
endotelial - VEGF - e a profundidade da invasão
trofoblástica na parede tubária em gestações
ampulares**

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

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dr. Pedro Paulo Pereira

**SÃO PAULO
2008**

FÁBIO ROBERTO CABAR

**Concentração sérica do fator de crescimento vascular
endotelial - VEGF - e a profundidade da invasão
trofoblástica na parede tubária em gestações
ampulares**

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

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Dr. Pedro Paulo Pereira

**SÃO PAULO
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cabar, Fábio Roberto

Concentração sérica do fator de crescimento vascular endotelial – VEGF – e a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária em gestações ampulares / Fábio Roberto Cabar. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Pedro Paulo Pereira.

Descritores: 1.Gravidez ectópica 2.Gravidez tubária 3.Trofoblastos 4.Fatores de crescimento do endotélio vascular 5.Gonadotropina coriônica humana subunidade beta.

USP/FM/SBD-382/08

Esta tese é dedicada:

A meus pais, **Roberto e Ester**, pelo Amor incondicional.

A **Laura**, mãe com açúcar, e Daniel, melhor amigo.

Às minhas mulheres, **Roberta e Camila**, motivo
da Vida e de Felicidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Maria Aparecida Baccega e José Adolfo de Granville Ponce. Como se pais fossem, possibilitaram que tudo se tornasse realidade.

A **Pedro Paulo Pereira**, amigo, pelos ensinamentos e apoio constantes durante o convívio diário.

**“Uma meta sem um plano
Não passa de um desejo”
(Antoine de Saint-Exupéry)**

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, digníssimo professor titular de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas oportunidades de aprimoramento científico e didático.

A **Dra. Regina Schultz**, mais uma vez essencial para a realização desse estudo.

A **Prof. Dra. Roseli Mieko Yamamoto Nomura**, por me ensinar, corrigir e incentivar. Sempre.

A **Prof. Dra. Leila Antonângelo, Dra. Milena Marques Pagliarelli Acencio, Gabriela Gaspar Carnevale** (laboratório de pleura – InCor FMUSP), pela presteza, cuidado e profissionalismo na realização dos testes bioquímicos.

A **Dra. Rossana Pulcinelli Francisco**, pela participação no projeto de pesquisa desde sua elaboração e **Dra. Maria Rita Bortolotto**, por muito auxiliar no aprimoramento desse estudo.

Ao **Dr. Nélon Antunes Jr. e Dr. Jonathas Borges Soares**, por me oferecer a chance de viver a Medicina de forma especial, do jeito que sempre a imaginei.

A **Dra. Vera Lúcia Hanna**, quem me ensinou a expressar-me na Língua-Pátria.

A Sra. **Inez Muras Fuentes Jazra**, pela presteza e auxílio para o cumprimento de prazos durante a realização desta tese.

***“Gracias a la vida, que me ha dado tanto
Me ha dado el corazón, que agita su marco
Cuando mira el fruto del cerebro humano
Cuando mira el bueno tan lejos del malo
Cuando mira el fondo de tus ojos claros”***

(Violeta Parra)

Esta tese está de acordo com:

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DA LITERATURA	12
4. MÉTODOS	24
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS	66

APÊNDICES

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

β -hCG	fração beta da gonadotrofina coriônica humana
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
dp	desvio-padrão
<i>et al.</i>	e outros; e colaboradores
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
GE	gestação ectópica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HE	hematoxilina-eosina
hPL	lactogênio placentário humano
IC	intervalo de confiança
kDA	quilodáltons
MTX	metotrexato
mUI/mL	miliunidades internacionais por mililitro
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
pg/mL	picograma por mililitro
PMSP	Prefeitura Municipal de São Paulo
RNA	ácido ribonucléico
ROC	<i>receiver operator characteristic curve</i>
UI/L	unidades internacionais por litro
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

RESUMO

Cabar FR. *Concentração sérica do fator de crescimento vascular endotelial – VEGF - e a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária em gestações ampulares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 86 p.

INTRODUÇÃO: A definição de fatores preditivos de lesão morfológica e funcional da tuba uterina poderia colaborar na escolha do tratamento de pacientes com gestação ectópica. O objetivo deste estudo foi relacionar a penetração do tecido trofoblástico na parede tubária acometida por gestação ampular com a concentração sérica materna de VEGF, avaliar a possibilidade do VEGF prever a profundidade da invasão do tecido trofoblástico, comparando o desempenho do VEGF com o desempenho das concentrações séricas de β -hCG na predição da profundidade da invasão do trofoblasto.

MÉTODOS: realizou-se estudo prospectivo, entre 21 de dezembro de 2006 a 30 de setembro de 2007, com 30 pacientes com gestação tubária ampular submetidas à salpingectomia. Foram dosadas as concentrações séricas maternas de VEGF após confirmação do diagnóstico de gestação tubária e antes da realização da salpingectomia. Histologicamente a invasão trofoblástica na parede tubária foi classificada em grau I: quando limitada à mucosa da tuba uterina; grau II: até a camada muscular; grau III: invasão de toda a espessura da tuba uterina.

RESULTADOS: 10 pacientes tiveram infiltração tubária grau I, 9 pacientes infiltração grau II e 11 pacientes infiltração grau III. Os diferentes graus de invasão trofoblástica apresentaram diferença significativa das concentrações séricas de VEGF ($p < 0,001$). O título sérico de VEGF de 305 pg/mL apresentou sensibilidade de 100,0%, especificidade de 85,0%, valor preditivo positivo de 76,9% e valor preditivo negativo de 100,0% para determinar invasão trofoblástica grau I. Título sérico de 425,9 pg/mL foi o melhor ponto de corte para predição de invasão trofoblástica grau III: sensibilidade de 81,8%, especificidade de 94,7%, valor preditivo positivo de 90,0% e valor preditivo negativo de 90,0%. Regressão logística selecionou a concentração sérica de VEGF como fator de melhor desempenho na predição da invasão trofoblástica quando comparado com título sérico de β -hCG.

CONCLUSÕES: em gestações ampulares, a profundidade da penetração do tecido trofoblástico na parede tubária acometida por gestação ectópica se relaciona com a concentração sérica de VEGF, a concentração sérica de VEGF é preditora da profundidade da invasão do tecido trofoblasto na parede tubária acometida por GE e a concentração sérica de VEGF apresenta melhor desempenho que a concentração sérica de β -hCG como preditora da profundidade da invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina acometida por gestação ampular.

Descritores: gravidez ectópica; gravidez tubária; trofoblastos; fatores de crescimento do endotélio vascular; gonadotropina coriônica humana subunidade beta.

SUMMARY

Cabar FR. *Serum concentration of the vascular endothelial growth factor - VEGF - and the depth of trophoblastic invasion into the tubal wall in ampular pregnancies* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 86 p.

INTRODUCTION: The definition of predictive factors of morphologic and functional damage to the Fallopian tube may help in the choice of treatment for patients with ectopic pregnancy. The objective of the present study was to correlate the depth of penetration of trophoblastic tissue into the tubal wall with maternal serum VEGF concentrations, to evaluate the prediction of this invasion based on these concentrations and to compare the performances of VEGF and β -hCG as predictors of trophoblastic invasion. **METHODS:** A prospective study was conducted on 30 patients with ampular pregnancy submitted to salpingectomy between December 21st, 2006 and September 30th, 2007. Maternal serum VEGF concentrations were measured after the diagnosis confirmation and before salpingectomy was performed. Histologically, trophoblastic invasion into the tubal wall was classified as grade I when limited to the tubal mucosa, grade II when reaching the muscle layer, and grade III when comprising the full thickness of the Fallopian tube. **RESULTS:** ten patients had tubal infiltration grade I, nine had grade II and eleven had grade III. The different levels of trophoblastic invasion were significantly associated with VEGF concentrations ($p < 0.001$). VEGF levels of 305.0 pg/mL showed 100.0% sensitivity, 85.0% specificity, a positive predictive value of 76.9% and a negative predictive value of 100.0% for the diagnosis of grade I trophoblastic invasion. A VEGF titer of 425.9 pg/mL was the best cut-off for the prediction of grade III trophoblastic invasion: 81.8% sensitivity, 94.7% specificity, positive predictive value of 90.0% and negative predictive value of 90.0%. Logistic regression showed that VEGF presented higher performance as a predictor of trophoblastic invasion than β -hCG. **CONCLUSIONS:** in ampullary pregnancies, the depth of penetration of trophoblastic tissue into the tubal wall is correlated with serum VEGF concentrations, serum VEGF titer is predictor of the depth of penetration into tubal wall and VEGF concentrations present higher performance than β -hCG as predictor of the trophoblastic invasion.

Keywords: ectopic pregnancy; tubal pregnancy; trophoblasts; vascular endothelial growth factor; human chorionic gonadotropin beta subunit.

Introdução 1

A gestação ectópica (GE) é definida por Cunningham et al. (2005) como a implantação e o desenvolvimento do ovo fora da cavidade corporal do útero. De acordo com esta definição, são consideradas GE aquelas em que a implantação do tecido trofoblástico se dá nas regiões intersticial e cervical do útero, na tuba uterina, cavidade abdominal e superfícies ovarianas, o mesmo sendo admitido por outros autores como Neme et al. (2006), Cabar (2008) e Zugaib (2008). Por outro lado, Rezende (2005) apresenta definição pouco distinta: deve-se definir GE como a implantação do ovo fora do útero, reservando denominação diversa para situações em que a nidadação ocorre nos cornos ou na cérvix do útero.

Em virtude de sua elevada incidência, morbidade e mortalidade, o estudo da GE representa importante tema dentro da Obstetrícia moderna. Nos Estados Unidos, o número de pacientes com GE aumentou de 17 800 / ano no início da década de 70 para mais de 108 000 casos / ano no início dos anos 90, com sua prevalência chegando a 2% de todas as gestações (Marchbanks et al., 1988; CDC, 1995; Bjartling et al., 2000); naquele país, a GE é a principal causa de morte materna no primeiro trimestre da gestação (Chang et al., 2003; ACOG, 2008). No Reino Unido são diagnosticados cerca de 11 000 casos por ano (incidência de 11,5 por 1 000 gestações) e a GE representa a quarta causa de morte materna (Crowhurst e Plaat, 1999; Lewis e Drife, 2004).

O aumento da incidência de GE nos últimos anos tem sido atribuído ao crescimento de alguns fatores de risco - grande prevalência de doenças sexualmente transmissíveis (especialmente infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*), aumento da prática de esterilização tubária e posterior tentativa de reversão, utilização mais freqüente de tecnologias de reprodução assistida, primiparidade tardia, realização de aborto induzido, utilização de contracepção de emergência, falha de métodos contraceptivos - e ao aprimoramento dos métodos propedêuticos: ultrasonografia transvaginal e dosagem sérica da fração beta da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG), que possibilita o diagnóstico de GE em regressão espontânea que no passado era despercebida (Chow et al., 1987; Marchbanks et al., 1988; Coste et al., 1991; Fernandez et al., 1991; Job-Spira et al., 1993; Mol et al., 1995; Parazzini et al., 1995; Coste et al. 1996; Egger et al., 1998; Bouyer et al., 2003; Pereira et al., 2005; Barnhart et al., 2006; Bakken et al., 2007a; Bakken et al., 2007b; Cabar et al., 2007a; Cabar, 2007; Bakken, 2008).

O aprimoramento dos métodos propedêuticos possibilita, também, a diminuição na mortalidade materna, na medida em que os casos de GE são diagnosticados mais precocemente (80% das vezes antes da ruptura). Acredita-se que a morbidade e a mortalidade associadas à GE são diretamente influenciadas pelo intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o início do tratamento (Department of Health, 1998). Em 1970 a mortalidade nos EUA era de 35,5 mortes para cada 10 000 casos de GE, chegando a 2,6 para cada 10 000 casos em 1992; no Reino Unido, a mortalidade passou de 16 para 3 mortes a cada 10 000 gestações entre 1973 e 1993 (NCHS, 1994; RCOG,

2001). Mesmo assim a GE continua a ser a principal causa de morte materna no primeiro trimestre da gravidez (três quartos dos casos), respondendo por 9 a 13% de todas as mortes ocorridas no ciclo gravídico-puerperal em países desenvolvidos (NCHS, 1994; RCOG, 2001; Turner et al., 2002). A GE foi responsável por 3,0% dos casos de mortalidade materna de causa obstétrica no município de São Paulo no biênio 2003-2004 e é a segunda causa de morte materna no primeiro trimestre de gestação, apenas atrás de causa relacionada aos abortamentos (Comitê Central de Mortalidade Materna – PMSP).

A tuba uterina é estrutura anatômica bilateral, com 10 cm a 12 cm de comprimento, podendo ser identificados quatro segmentos de limites pouco precisos: infundíbulo, ampola, istmo e porção intersticial. O segmento mais lateral, chamado infundíbulo, tem cerca de um centímetro de comprimento e contém fímbrias na sua extremidade que captam o óvulo na cavidade peritoneal. A região ampular compreende o segmento medial ao infundíbulo, é a mais longa e o local onde, na maioria das vezes, ocorre a fertilização do óvulo. O istmo está localizado medialmente à porção ampular e é o segmento que apresenta o lúmen mais estreito de todo o órgão. A porção chamada intramural ou intersticial corresponde à região de implantação tubária no miométrio dos cornos uterinos (Gasser e Peppler, 1986). Cerca de 97% a 99% das GE são tubárias e, dessas, quase 75% ocorrem na porção ampular da tuba uterina (Bouyer et al., 2002).

Histologicamente, a tuba uterina é estrutura seromuscular cuja parede é composta por três camadas distintas: túnica serosa, camada muscular e mucosa. A túnica serosa, a mais externa camada, é constituída por fibroblastos, adipócitos, macrófagos e mastócitos, entremeados por fibras elásticas e de colágeno. A camada muscular é composta por fibras musculares lisas dispostas longitudinalmente e em feixes circulares, de forma que, nas regiões intramural e ístmica, essas fibras são mais delgadas. A mucosa é formada por lâmina própria de tecido conectivo altamente vascularizado e de epitélio colunar simples constituído por tipos celulares distintos: ciliadas, secretoras, indiferenciadas e as células intercaladas (*peg-cells*) (Peppler e Thompson, 1993).

As tubas uterinas sofrem mudanças cíclicas em sua histologia e atividade ciliar em resposta aos estímulos dos esteróides sexuais (Critoph e Dennis, 1977; Lyons et al., 2006). Estes órgãos não representam apenas um canal por onde migra o óvulo após sua liberação pelo ovário; além de recolhê-lo, os cílios de seu epitélio colunar favorecem o contato com os espermatozóides que vêm impulsionados na direção contrária. É ainda nas tubas onde há a capacitação espermática e a fecundação, ocorrendo depois o transporte do ovo até a cavidade uterina (Jansen, 1984; Lyons et al., 2006). O transporte do óvulo e do zigoto pela tuba uterina é resultado da combinação de fatores que envolvem a motilidade ciliar e o peristaltismo muscular (Pulkkinen e Talo, 1987), sem que se saiba, ainda, qual mecanismo desempenha principal papel no transporte através da tuba uterina. Observou-se que a inibição da atividade muscular com a utilização de isoproterenol (droga agonista

β -adrenérgica), não altera o tempo total do transporte dos gametas e embriões através da ampola tubária. Isto poderia indicar que os cílios, sozinhos, seriam capazes de desempenhar a função de transportar o óvulo até o sítio onde ocorre sua fecundação (Halbert et al., 1976; McComb et al., 1986; Halbert et al., 1989). Por outro lado, a observação de que pacientes com total inatividade ciliar congênita (Síndrome de Kartagener) são capazes de ter gestações tópicas faz com que alguns autores acreditem que a atividade peristáltica da tuba representa o mecanismo principal no transporte do zigoto até a cavidade uterina (Afzelius et al., 1978; Cartwright, 1993; Blyth e Wellesley, 2008).

Tubas acometidas por GE freqüentemente exibem alterações morfológicas e funcionais, como focos persistentes de transformação decidual, divertículos ou alterações pós-inflamatórias, bem como destruição de células ciliadas ou redução da atividade ciliar (Vasquez et al., 1983; Green e Kott, 1989). Quando as GE são tratadas conservadoramente, estas anormalidades podem permanecer, a despeito do tratamento ser instituído de forma adequada (Green e Kott, 1989). Além disso, a implantação do tecido trofoblástico na parede tubária pode acarretar prejuízo na função do oviduto, seja por conta da alteração do epitélio ciliar ou, principalmente, pelo desarranjo arquitetural da musculatura da parede do órgão causado pela reação inflamatória (Vasquez et al., 1983; Green e Kott, 1989). Este desarranjo muscular pode deixar o órgão hipoplásico, sujeito a discinesias (hipocinesia e espasmos tubários), aumentando o risco de ocorrência de novo episódio de GE (Green e Kott, 1989; Rezende, 2005). Dessa forma, acredita-se que o comprometimento da função

da tuba uterina é dependente do grau de invasão do trofoblasto na parede tubária (Green e Kott, 1989).

Vários fatores têm sido estudados como possíveis preditores da integridade tubária em pacientes acometidas por GE e submetidas a tratamento clínico: exame físico, ultra-sonografia transvaginal (presença de atividade cardíaca, características da imagem ectópica, presença de líquido em pelve), concentração sérica da β -hCG, concentração sérica de hemoglobina. Estes fatores se mostraram eficientes na predição de sucesso do tratamento clínico e alguns deles também poderiam ser utilizados para estimar lesões microscópicas na estrutura histológica das tubas uterinas causados pela implantação do trofoblasto (Oktay et al., 1994; Klein et al., 1995a; Klein et al., 1995b; Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006, Pereira et al., 2008). Estudos anteriores demonstram que a concentração sérica materna de β -hCG apresenta elevados valores de sensibilidade e especificidade na predição da profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede tubária (Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006). Os autores sugerem que os títulos séricos deste hormônio podem ser utilizados para a definição do tipo de tratamento a ser oferecido às pacientes acometidas por gestação tubária.

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 vascular endotelial (VEGF), desempenha papel de destaque. Essa substância age como principal fator parácrino e autócrino, modulando o crescimento, a remodelação e a permeabilidade vascular no endométrio, decídua e trofoblasto. É também indispensável durante o desenvolvimento vascular do embrião (Senger et al., 1983; Leung et al., 1989; Clark et al., 1996; Shifren et al., 1996; Torry et al., 1996; Torry e Torry, 1997; Neufeld et al., 1999). Sua secreção e expressão dependem de outros fatores de crescimento e de algumas citocinas e também são influenciadas pelas condições teciduais locais. Em situações de hipoxia tecidual sua produção encontra-se aumentada (Leung et al., 1989; Torry e Torry, 1997; Neufeld et al., 1999).

As condições do tecido tubário são desfavoráveis para a implantação do trofoblasto, muito distintas daquelas observadas no endométrio que é muito vascularizado (Shifren et al., 1996; Torry et al., 1996; Torry e Torry, 1997). Alguns autores acreditam que, pela vigência de hipoxia tecidual da tuba uterina, a implantação do produto conceptual neste órgão ocasiona aumento da produção de VEGF pelo trofoblasto e maior angiogênese, na tentativa de acomodação ao ambiente desfavorável (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002; Mueller et al., 2004; Fasouliotis et al., 2004; Cabar et al., 2007b). Desta forma, a dosagem dos níveis séricos de VEGF pode ser utilizada para

diagnosticar precocemente os casos de GE (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002; Cabar et al., 2008).

A definição de fatores indicativos do grau de lesão morfológica e funcional da tuba uterina acometida por GE pode colaborar na escolha do tratamento para pacientes com desejo reprodutivo futuro. Dessa forma, propostas de tratamento conservador poderiam ser recomendadas para casos com tubas pouco comprometidas, melhorando o prognóstico reprodutivo. Por outro lado, a preservação de tubas uterinas extensamente danificadas pode ser evitada, pois além de retardar nova gestação, tal conduta aumenta sobremaneira a morbidade decorrente de um novo episódio de GE. A hipótese é que a maior produção de VEGF possibilita maior invasão trofoblástica no sítio de implantação extra-uterino, com conseqüente maior comprometimento da parede tubária, maior risco de sangramento e de ruptura desta estrutura.

Portanto, a possibilidade da utilização de novos marcadores bioquímicos na predição do grau de invasão trofoblástica nos casos de GE justifica a realização da presente investigação. Na prática clínica, estes marcadores podem auxiliar no manejo dos casos, favorecendo a identificação de situações de melhor prognóstico para terapêuticas conservadoras ou de casos em que a cirurgia radical, salpingectomia, é imperativa.

Objetivos 2

O presente estudo sobre a penetração do tecido trofoblástico na parede tubária acometida por gestação ampular teve por objetivos:

- 1) Relacionar a profundidade de penetração do trofoblasto com as concentrações séricas de VEGF;
- 2) Avaliar a possibilidade da concentração sérica de VEGF predizer a profundidade da invasão do trofoblasto;
- 3) Comparar o desempenho das concentrações séricas de VEGF com o desempenho das concentrações séricas de β -hCG na predição da profundidade da invasão do trofoblasto.

Revisão da Literatura 3

3.1 MARCADORES DA INVASÃO TROFOBLÁSTICA

Nas gestações tubárias, após a implantação do blastocisto na mucosa da tuba uterina, a inexistência da reação decidual possibilita ao tecido trofoblástico invadir a lâmina própria, a camada muscular e atingir a subserosa da estrutura (Budowick et al., 1980). Randall et al. (1987) estudam a implantação em 105 gestações tubárias e concluem que este processo ocorre de maneira semelhante ao verificado no útero. O trofoblasto invade o espaço intersticial e os vasos tubários, sendo comum o desenvolvimento da placenta na subserosa ou serosa tubária. Os autores afirmam, ainda, que a habilidade de implantação do blastocisto na tuba uterina indica que o processo de placentação depende exclusivamente do potencial de invasão do tecido trofoblástico e que os tecidos maternos desempenham papel passivo nesses processos. Também Dietl et al. (1988), após revisão de 12 tubas retiradas cirurgicamente, publicam estudo afirmando que o blastocisto penetra as lâminas própria e muscular da tuba uterina logo após sua nidação; para eles, esse comportamento seria comparável à invasão do trofoblasto de placenta com acretismo. Esse fato explicaria a maior probabilidade de persistência do tecido trofoblástico após cirurgia conservadora (Budowick et al., 1980; Dietl et al., 1988).

Vários fatores têm sido estudados como possíveis preditores da profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária. Dentre eles, a concentração sérica da β -hCG se destaca por apresentar elevados valores de sensibilidade e especificidade na predição da profundidade de invasão do trofoblasto (Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006), além de ser exame de baixo custo e rápida obtenção de resultados, o que a torna ferramenta indispensável para a realização de diagnóstico e para decisão da conduta a ser tomada.

Oktay et al. (1994) são os primeiros que relacionam o grau de invasão do tecido trofoblástico na musculatura da tuba uterina com os títulos séricos da β -hCG. Os autores estudam 27 tubas uterinas removidas por estarem acometidas por GE ampulares. Em nove casos notam invasão da camada muscular da tuba e, nesse grupo, as concentrações séricas da β -hCG dosadas nas últimas 24 horas prévias à cirurgia estão significativamente maiores que no grupo no qual não ocorre a invasão muscular ($13\,665 \pm 2\,986$ mUI/mL e $2\,169 \pm 870$ mUI/mL, respectivamente, $p = 0,0001$). Afirmam que o valor sérico de β -hCG igual ou superior a 5 400 mUI/mL apresenta 89% de valor preditivo positivo para determinação da invasão da camada muscular da tuba uterina. Por outro lado, dos 18 casos estudados sem invasão muscular, 17 apresentam títulos séricos da β -hCG inferiores a 5 400 mUI/mL (valor preditivo negativo de 94%). Os autores discutem que a invasão da camada muscular pode dificultar a remoção completa do tecido trofoblástico numa abordagem terapêutica conservadora; a ausência dessa invasão representa fator determinante de sucesso desses tratamentos.

Klein et al. (1995b) estudam a relação entre a profundidade da invasão trofoblástica e a dosagem da β -hCG sérica nas gestações tubárias, comparando as concentrações desse hormônio com a histopatologia das peças cirúrgicas provenientes de salpingectomia ou ressecção segmentar da tuba uterina acometida por GE. As pacientes com concentrações séricas pré-operatórias abaixo de 2 500 UI/L (grupo I, 13 casos) apresentam tecido trofoblástico restrito ao lúmen da tuba em 84,6% dos casos, proporção significativamente maior que a observada naquelas com títulos maiores que esse valor (grupo II, 18 casos); no grupo II a penetração da camada muscular é mais freqüente ($p= 0,0045$), sendo que em apenas três dos 18 casos (16,7%) não se observa a invasão. Os autores sugerem que títulos séricos elevados de β -hCG poderiam estar associados à destruição da parede tubária, inviabilizando o tratamento conservador.

Natale et al. (2003) realizam estudo prospectivo envolvendo 32 pacientes com diagnóstico de GE submetidas à salpingectomia laparoscópica. Os autores avaliam as tubas por meio de exame anatomopatológico e correlacionam a extensão da invasão do tecido trofoblástico na parede tubária com os títulos séricos de β -hCG no dia da cirurgia. A concentração sérica de β -hCG é proporcional ao grau de invasão da tuba uterina com diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p= 0,004$). Todas as pacientes com concentração sérica desse hormônio superior a 6 000 mUI/mL apresentam invasão trofoblástica até, pelo menos, a camada muscular da tuba uterina. Por outro lado, apenas 35% das pacientes com invasão tecidual até subserosa da tuba tinham concentração de

β -hCG inferior a 1 500 mUI/mL. Os autores ressaltam que os tratamentos conservadores apresentam maior risco de persistência do tecido trofoblástico e de recorrência de GE. O prognóstico reprodutivo após gestação tubária estaria relacionado ao estado da tuba remanescente. O título de β -hCG parece indicar o grau de invasão do trofoblasto na tuba uterina e justifica-se a realização de salpingectomia principalmente para casos em que as concentrações séricas deste hormônio se encontrem acima de 6 000 mUI/mL.

Estudo de Latchaw et al. (2005) analisa os fatores de risco associados à rotura tubária. Os autores estudam 738 casos de gestação tubária durante sete anos e encontram associação entre concentração sérica de β -hCG e rotura tubária. Quando os títulos séricos desse hormônio estão acima de 5 000 mUI/mL, existe 1,85 vezes mais chance de rotura da tuba uterina acometida (OR 1,85; IC 95% 1,12 – 3,06).

Em concordância com os demais estudos, Cabar et al. (2006) realizam estudo com 105 casos de gestação ampular submetidas a salpingectomia e verificam que a profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede tubária tinha relação com as concentrações séricas pré-operatórias de β -hCG, mas não com a idade gestacional nem com o tamanho da massa ectópica identificada à ultra-sonografia. Os autores mostram que títulos séricos de β -hCG inferiores a 2 400 mUI/mL poderiam predizer invasão trofoblástica limitada à camada mucosa da parede tubária com sensibilidade de 82,8%, especificidade de 85,5%, VPP de 68,6% e VPN de 92,7% (acurácia de 84,8%). Por outro lado, título sérico de β -hCG de 5 990 mUI/mL seria capaz de predizer

invasão trofoblástica de toda a espessura da parede tubária com 82,6% de sensibilidade, 74,6% de especificidade, 71,7% de VPP e 84,6% de VPN (acurácia 78,1%). Eles sugerem que os casos que apresentem níveis séricos de β -hCG maiores que 6 000 mUI/mL devam ser tratados por meio de salpingectomia.

3.2 VEGF

Em 1983, um peptídeo de sequência de aminoácidos até então desconhecida é isolado de líquido em porcos com ascite (Senger et al., 1983). Por apresentar característica de permeabilidade vascular cerca de 10 000 a 50 000 vezes maior que a histamina, esta substância é inicialmente denominada fator de permeabilidade vascular. Posteriormente, em 1989, identificam-se seu efeito mitótico sobre células do endotélio vascular e suas propriedades como potente estimulador da neovascularização e do crescimento celular endotelial, havendo mudança do nome deste peptídeo que passa a ser chamado de fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor - VEGF*) (Senger et al., 1990; Klagsbrun e D'Amore, 1996).

A família dos polipeptídios VEGF é composta pelos subgrupos VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e o fator de crescimento placentário (placental growth factor – PIGF). O subgrupo mais extensivamente estudado até o momento é o VEGF-A, uma proteína de aproximadamente 40 kDa, fundamental no desenvolvimento embrionário. Esta proteína age em vários componentes da angiogênese como proliferação e migração de células endoteliais, mecanismo de sobrevivência e migração celular endotelial e aumento da permeabilidade vascular (Shweiki et al., 1992; Carmeliet e Jain, 2000). O VEGF-B parece estar relacionado com as coronárias, o VEGF-C está implicado na formação dos vasos linfáticos e os subtipos VEGF-D e VEGF-E são ainda pouco estudados (Nakagawa et al., 2000). Até o presente há seis isoformas conhecidas de VEGF-A em humanos: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ e cada uma desempenha um papel diferente no processo de angiogênese (Ferrara, 2004). As diferentes isoformas do VEGF interagem com os três receptores de VEGF identificados: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3.

O VEGF e suas isoformas são produzidos e secretados por uma série de células normais e estão presentes em diversos tecidos humanos. Esta presença se faz necessária para o adequado desempenho funcional de vários órgãos. Como exemplo, sabe-se que durante o processo de implantação e placentação o VEGF desempenha papel de destaque na remodelação e na permeabilidade vascular no endométrio, decídua e trofoblasto e no desenvolvimento vascular do embrião; a ausência desta proteína durante o desenvolvimento do produto conceptual é letal (Shifren et al., 1996; Torry et al.,

1996; Torry e Torry, 1997; Neufeld et al., 1999). O VEGF também tem efeito neuroprotetor direto em neurônios *in vitro* após lesão isquêmica (Jin et al., 2000). Além disso, esse peptídeo tem sido associado à neovascularização ocular em doenças como retinopatia diabética, oclusões venosas retinianas e retinopatia da prematuridade (Adamis et al., 1994), neovascularização tumoral em neoplasias colorretais (Cubo et al., 2004), de colo útero (Zusterzeel et al., 2008), ovário (Cooper et al., 2002) entre outros.

O VEGF estimula a angiogênese direta e indiretamente. Além de ser um potente mitógeno de células endoteliais (Leung et al., 1989; Ferrara et al., 1992), o VEGF aumenta a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e facilitando a penetração dos neovasos nos tecidos (Lamoreaux et al., 1998; Hiratsuka et al., 2002), ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases (Lamoreaux et al., 1998; Hiratsuka et al., 2002). O VEGF também possui efeito pró-inflamatório (Moromizato et al., 2000; Sakurai et al., 2003; Usui et al., 2004), neuroprotetor (Storkebaum e Carmeliet, 2004), e é um fator importante na estabilização e remodelação vasculares (Benjamin et al., 1998).

3.3 VEGF E GESTAÇÃO ECTÓPICA

O VEGF é indispensável durante o desenvolvimento vascular do embrião (Carmeliet et al., 1996). De maneira diversa ao que ocorre com a hCG, que é trofoblasto-dependente, este fator angiogênico é produzido tanto pelas células trofoblásticas quanto pelas células endometriais (Evans et al., 1998). Esta característica é extremamente importante porque a principal diferença entre as gestações tópicas e as ectópicas não é a viabilidade do embrião, mas fundamentalmente o tecido onde o embrião se implanta.

As condições do tecido extra-uterino onde ocorre a implantação da GE são muito diferentes daquelas presentes no endométrio. As condições hipoxêmicas usualmente verificadas no sítio de implantação ectópico ocasionariam aumento na produção de VEGF (Ladoux e Frelin, 1993; Lam et al., 2004). Lam et al. (2004) dosam a expressão do RNA mensageiro do VEGF e de seus receptores (KDR e flt-1) nos sítios de implantação e nos sítios onde não houve implantação do saco gestacional ectópico em tubas uterinas humanas e descrevem que a expressão destes RNA mensageiros estava significativamente aumentada no sítio de implantação nas tubas uterinas acometidas por GE. Os autores sugerem que o VEGF seria o fator angiogênico responsável pela implantação da GE no oviduto.

Daniel et al. (1999) foram os primeiros a observar que as concentrações séricas de VEGF eram mais elevadas em pacientes com GE quando comparadas às pacientes com gestações tópicas não-evolutivas. Eles realizam estudo prospectivo com 20 mulheres acometidas por gestação tubária e sugerem que as concentrações séricas de VEGF são mais específicas e apresentam melhor valor preditivo positivo (VPP) que os títulos séricos de progesterona na diferenciação dos diversos tipos de gestação. O estudo também sugere que título sérico de VEGF > 200 pg/mL diferencia gestações tópicas evolutivas de gestações ectópicas com 90% de especificidade e VPP de 86% e gestações tópicas não-evolutivas de gestações ectópicas com 80% de especificidade e VPP de 86%.

Estes achados foram posteriormente confirmados por outros autores; Felemban et al. (2002) estudam 45 gestantes (gestação ectópica, gestações tópicas evolutivas e não evolutivas – 15 casos em cada grupo) e determinam que valores de corte de 200 pg/mL (concentração sérica de VEGF) distinguem gestações tópicas evolutivas de gestações tubárias com sensibilidade de 88%, especificidade de 100% e VPP de 100%. Para a diferenciação entre GE e gestação tópica não-evolutiva, a sensibilidade deste valor de corte é de 87,5%, especificidade de 75% e VPP de 77,8%. Mueller et al. (2004), em estudo semelhante, encontram títulos séricos de VEGF mais altos em mulheres acometidas por GE quando comparadas com aquelas portadoras de gestação tópica com comparáveis idades gestacionais. Daponte et al. (2005), comparam as concentrações séricas de VEGF de 27 mulheres com GE e 21 pacientes com gestação tópica e verificam que estas concentrações eram

significativamente mais elevadas no primeiro grupo (227,2 pg/mL e 107,2 pg/mL respectivamente, $p < 0,001$). Estudando população submetida a tratamento de infertilidade por meio de fertilização *in vitro* (FIV), Fasouliotis et al. (2004) encontram resultados semelhantes aos anteriormente apresentados; no grupo de mulheres que se submeteram a FIV e que tiveram GE, as concentrações séricas de VEGF no 11º dia após transferência embrionária eram mais elevadas que nas demais mulheres tratadas.

Em nosso meio, Cabar et al. (2007b) estudam 60 gestantes que se apresentaram em Serviço de Emergência com queixa de sangramento genital e/ou dor abdominal. Após confirmação diagnóstica, as mulheres foram divididas em três grupos: gestação tópica evolutiva, gestação tópica não-evolutiva e gestação tubária. A concentração sérica de VEGF variou de 15,6 a 783,1 pg/mL entre as pacientes de todos os grupos. A análise estatística demonstrou que a concentração desta substância foi significativamente diferente entre os grupos e que títulos mais elevados foram encontrados nas mulheres do com gestação tubária quando comparadas às demais pacientes ($P < 0,001$). Concentrações séricas de VEGF $> 188,7$ pg/mL podiam diferenciar gestação tubária de gestações tópicas com 96,7% de sensibilidade, 95% de especificidade, 90,6% de valor preditivo positivo e 98,3% de valor preditivo negativo.

Destaca-se que existem dados na literatura que divergem dos anteriores. Kucera-Sliutz et al. (2002) não encontram diferença entre os níveis séricos de VEGF em mulheres com GE e com gestação tópica não-evolutiva. Os autores concluem que única dosagem sérica desta substância não poderia ser utilizada para diagnóstico de GE. Estudo prospectivo semelhante envolvendo 86 pacientes foi realizado por Ugurlu et al. (2008); os autores incluíram 29 pacientes com gestação ectópica, 29 mulheres com gestações tópicas normais e 28 pacientes com abortamentos espontâneos, todas pareadas pela idade gestacional e não encontram diferença significativa nas concentrações séricas de VEGF entre as mulheres com GE e as demais gestantes. Eles não recomendam a utilização da concentração sérica de VEGF para o diagnóstico de GE.

Ainda não há estudos na literatura que relacionem a profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina com níveis séricos de VEGF.

Métodos 4

4.1 TIPO DE ESTUDO

Realizou-se estudo prospectivo, transversal e comparativo envolvendo pacientes com 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 21 de dezembro de 2006 a 30 de setembro de 2007. O presente estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) sob número 1118/06 (Apêndice A).

As pacientes atendidas no Setor de Obstetrícia de Emergência da Clínica Obstétrica do HCFMUSP com quadro clínico sugestivo de GE foram submetidas ao algoritmo preconizado para diagnóstico de GE (Apêndice B). Após confirmação do diagnóstico de GE, as pacientes foram encaminhadas para tratamento conservador (clínico ou cirúrgico) ou radical, conforme seu estado hemodinâmico, desejo de preservação do potencial reprodutivo, concentração e evolução da β -hCG sérica, quantidade de líquido livre na pelve e tamanho da massa ectópica avaliados pela ultra-sonografia, seguindo o protocolo estabelecido pelo Setor de Emergência da Clínica Obstétrica do HCFMUSP (Pereira, 2007).

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

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

No período em questão, foram atendidas no Setor de Obstetrícia de Emergência do HCFMUSP 52 mulheres com diagnóstico de GE. Destas, 30 pacientes foram selecionadas para participar do estudo, pois atendiam aos critérios de inclusão propostos:

- Diagnóstico de gestação tubária em região ampular;
- Realização de tratamento cirúrgico radical (salpingectomy);
- Gestação concebida espontaneamente, isto é, sem a utilização de nenhuma técnica de reprodução assistida;
- Coleta de sangue (para dosagem sérica de VEGF) antes da realização do procedimento cirúrgico;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Dos 22 casos que não foram incluídos no estudo, dois eram gestações cervicais, cinco casos eram gestações tubárias não-ampulares, 15 pacientes foram tratadas de maneira conservadora (clínica ou cirúrgica). Seriam excluídos os casos em que o diagnóstico de gestação ampular não pudesse ser confirmado por exame histopatológico. Nenhum caso foi excluído por este critério.

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A idade das pacientes variou de 17 a 43 anos, com média de 29,1 e desvio padrão (dp) de 5,8 anos. Quanto à distribuição racial, 16 mulheres (53,3%) eram brancas e as outras 14 (46,7%), não-brancas. A idade gestacional da população estudada variou de 42 a 56 dias, com média de 47,9 dias e dp de 4,9 dias. Em relação aos antecedentes obstétricos, oito mulheres (26,7%) eram nulíparas e em cinco casos (16,7%) havia história prévia de GE na tuba uterina contralateral.

4.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Em conformidade com a literatura, para cada variável explicativa utilizada na regressão logística são necessários de sete a 15 casos do desfecho estudado (Hair, 1998). No presente estudo, existem três possíveis desfechos: invasão trofoblástica grau I, II, ou III.

Estudo realizado por Cabar et al. (2006) observou que a invasão do tecido trofoblástico na parede das tubas uterinas obedeceu a seguinte proporção aproximada: 27% apresentaram invasão superficial (grau I), 28% invasão moderada (grau II) e 45% apresentaram invasão trofoblástica profunda (grau III).

Considerando estas proporções e pretendendo-se incluir ao menos sete casos em cada grupo, seriam necessários 25 casos. Com 20% de eventuais perdas e exclusões, determinou-se que 30 casos de gestação ampular deveriam ser incluídos na amostra para a realização da presente investigação.

4.4 COLETA DOS DADOS

Após confirmação do diagnóstico de GE, as pacientes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. Todas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A partir deste momento, amostras de sangue foram colhidas por punção venosa periférica. Foram obtidos 10 mL de sangue de cada paciente para determinação das concentrações séricas de VEGF. A amostra foi posteriormente encaminhada ao Instituto do Coração do HCFMUSP para armazenamento.

Os dados referentes ao atendimento de pacientes incluídas no presente estudo foram armazenados em um instrumento de coleta de dados para posterior análise. Os resultados das concentrações séricas de VEGF foram obtidos diretamente com a equipe de técnicos do laboratório responsável. Os resultados das concentrações séricas de β -hCG foram obtidos por meio de consulta à página eletrônica do Laboratório Central do HCFMUSP.

Após análise de todos os casos incluídos na investigação, a médica patologista responsável pela avaliação histológica forneceu ao pesquisador executante os resultados da classificação anatomopatológica de cada caso.

Todos estes dados foram então tabulados em uma planilha que foi entregue ao estatístico responsável pela análise dos dados.

4.5 VARIÁVEIS ESTUDADAS

4.5.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE VEGF

As amostras foram coletadas em tubos siliconados e imediatamente encaminhadas ao laboratório de pesquisa clínica do Departamento de Cardiopneumologia do Instituto do Coração do HCFMUSP. As amostras de sangue para determinação de concentração de VEGF foram deixadas em temperatura ambiente por 2 a 6 horas para que coagulassem; o soro foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C até que as determinações fossem realizadas. Para a dosagem de VEGF foi utilizado o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura, específica para molécula humana (R&D System, Inc., Minneapolis, EUA). A concentração sérica de cada sujeito da pesquisa foi dosada três vezes e a média dos valores foi considerada para fins de resultado final. Placas com 96 poços (Costar/Corning, Inc., Cambridge, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas, com solução de bloqueio (BSA 2%) e incubada por 2 horas a 37°C.

Após o bloqueio, foram adicionados as amostras e os padrões, diluídos previamente em PBS. Em dois poços foi colocado apenas o PBS para caracterização do branco da amostra. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C.

Após incubação, foi adicionado o anticorpo conjugado (biotinilado) na concentração estabelecida e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Posteriormente, foi adicionado Streptavidina HRP (1:250) e incubado por 30 minutos a 37°C.

A cada etapa, a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20) por seis vezes. A revelação foi realizada através da adição de Solução de Revelação (H₂O₂ + Tetrametilbenzidina) à placa, que foi incubada de 5 a 10 minutos a 37°C. A seguir, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 30% e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek, EUA) utilizando filtro de 450nm. A concentração mínima de detecção de VEGF é de 15,6 pg/mL. A sensibilidade do teste foi < 5,0 pg/mL, variabilidade intra-ensaio foi 5,1% com concentração de VEGF de 512 pg/mL.

4.5.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE β -hCG

A quantificação sérica de β -hCG foi realizada na Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. Esta dosagem foi obtida por meio de ensaio imunofluorimétrico de dois sítios, com base na técnica denominada “sanduíche” direto (1 235 AutoDELFIA *imunoassay system*, AutoDELFIA hCG, PerkinElmer, Finlândia). Coeficientes de variação interensaio e intra-ensaio eram, respectivamente, 5,1 e 3,9.

4.5.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA QUANTO À PROFUNDIDADE DA INVASÃO TROFOBLÁSTICA NAS TUBAS UTERINAS

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

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

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

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

- Grau I: infiltração trofoblástica limitada à mucosa da tuba uterina (figuras 1A e 1B);

Figura 1 – Imagem histopatológica de tuba uterina acometida por GE: invasão trofoblástica limitada à mucosa tubária à microscopia óptica. A: coloração HE – aumento 100X. B: coloração Masson – aumento 100X.

- Grau II: infiltração trofoblástica até a camada muscular da tuba uterina (figuras 2A e 2B);

Figura 2 – Imagem histopatológica de tuba uterina acometida por GE: invasão trofoblástica limitada à camada muscular tubária à microscopia óptica. A: coloração HE – aumento 200X. B: coloração hPL – aumento 200X.

- Grau III: infiltração trofoblástica envolvendo toda a espessura da tuba uterina, com ou sem ruptura de serosa (figuras 3A e 3B).

Figura 3 – Imagem histopatológica de tuba uterina acometida por GE: invasão trofoblástica envolvendo toda a espessura da parede tubária à microscopia óptica. A: coloração HE – aumento 200X. B: coloração Masson – aumento 100X.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1. ANÁLISE DESCRITIVA

As variáveis foram analisadas descritivamente e apresentadas como frequências absolutas e relativas.

4.6.2. GRUPOS

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

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

4.6.3. VARIÁVEIS ANALISADAS PARA COMPARAÇÃO DOS TRÊS GRUPOS

Os três grupos foram comparados quanto a:

I – concentração sérica materna de VEGF.

II – concentração sérica materna de β -hCG.

4.6.4. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

A hipótese de igualdade entre os grupos foi testada por meio de análise de variância a um fator. Nesse tipo de análise, foi realizado um teste de significância que indicou se a variável em questão (VEGF) se relacionava com a invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina. Foram verificadas as diferenças entre os grupos com uso de teste de Kruskal-Wallis.

A curva ROC foi utilizada na escolha do melhor ponto de corte. Para esta análise, a concentração sérica materna de VEGF e de β -hCG foram as variáveis independentes, sendo obtidos pontos de corte para os diferentes graus de invasão para cada uma das variáveis. Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos foram calculados baseados nos pontos-de-corte obtidos.

Foi utilizada a técnica de regressão logística para comparar o desempenho das variáveis de interesse (concentrações de VEGF e de β -hCG) com relação ao desfecho estudado (grau de invasão trofoblástica na parede da tuba) (Armitage et al., 2001; Hosmer Jr. e Lemeshow, 2004).

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

Resultados 5

5.1 PROFUNDIDADE DA INVASÃO TROFOBLÁSTICA

A distribuição dos 30 casos incluídos na presente pesquisa, de acordo com a profundidade da invasão trofoblástica na tuba uterina está apresentada no gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição das pacientes com GE de acordo com a classificação histológica da invasão trofoblástica na parede tubária – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos histológicos quanto à idade materna ($p= 0,69$). Da mesma forma, não foi observada diferença quanto à idade gestacional entre os três grupos, como pode ser observado na tabela 1 ($p= 0,88$).

Tabela 1 – Idade materna e idade gestacional e grau de infiltração do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Idade materna [anos] média (dp)*	Idade gestacional [dias] média (dp)**
I	31,0 (4,1)	48,9 (2,4)
II	30,3 (3,9)	48,5 (2,2)
III	28,7 (3,5)	48,8 (2,3)

* $p= 0,69$; ** $p= 0,88$
Teste Kruskal-Wallis

5.2 VEGF E GRAU DE INVASÃO TROFOBLÁSTICA

Os títulos séricos de VEGF variaram de 167,5 a 783,1 pg/mL, com média de 368,8 pg/mL e dp de 167,7 pg/mL. Por meio de análise de variância a um fator, observou-se que os diferentes graus de invasão trofoblástica apresentaram diferença estatisticamente significativa nos títulos de VEGF ($p < 0,001$) (tabela 2). O grau I apresentou valores significativamente menores que os graus II e III (tabela 3).

Tabela 2 - Títulos de VEGF e grau de infiltração do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	VEGF [pg/mL]	
	média* (dp)	mediana (mínimo - máximo)
I	220,7 (9,1)	209,0 (167,5 – 301,9)
II	365,8 (81,7)	348,6 (297,2 – 562,7)
III	505,8 (79,6)	497,8 (215,8 – 783,1)
Total	368,8 (167,7)	321,3 (167,5 – 783,1)

* $p < 0,001$
ANOVA

Tabela 3 – Comparação entre os títulos de VEGF e os diferentes graus de infiltração do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Valor Z	P
Grau I vs. Grau II	-2,85	0,004*
Grau I vs. Grau III	-4,22	<0,001*
Grau II vs. Grau III	-1,19	0,236

Teste de Kruskal-Wallis

5.3 β -hCG E GRAU DE INVASÃO TROFOBLÁSTICA

As concentrações séricas de β -hCG variaram de 108,4 a 46 165,0 mUI/mL, com média de 9 346,0 mUI/mL e dp de 11 028,0 mUI/mL. Teste de Kruskal-Wallis revelou correlação significativa entre os diferentes graus de invasão trofoblástica e concentrações séricas de β -hCG ($p < 0,001$) (tabela 4). O grau I apresentou valores significativamente menores que os graus II e III (tabela 5).

Tabela 4 - Títulos de β -hCG e grau de infiltração do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	β -hCG [mUI/mL]	
	média (dp)	mediana* (mínimo – máximo)
I	1 731,2 (1 085,8)	2 036,5 (108,4 – 3220,0)
II	9 720,8 (14 002,8)	3 912,0 (2228,8 – 46165,0)
III	15 961,7 (9 408,9)	16 100,0 (5 370,6 – 38 356,0)

* $p < 0,001$
Kruskal-Wallis

Tabela 5 – Comparação entre os títulos de β -hCG e os diferentes graus de infiltração do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Valor Z	P
Grau I vs. Grau II	-2,48	0,013*
Grau I vs. Grau III	-4,54	<0,001*
Grau II vs. Grau III	-1,87	0,061

Teste de Kruskal-Wallis

5.4 PREDIÇÃO DE INVASÃO TROFOBLÁSTICA GRAU I

5.4.1 VEGF

Calculou-se por meio de curva *ROC* um ponto de corte para predição da invasão trofoblástica grau I considerando-se a concentração sérica de VEGF (gráfico 2).

Gráfico 2 – Curva *ROC* para invasão trofoblástica grau I - VEGF – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Encontrou-se ponto de corte de valor de VEGF sérica para predição de grau I de invasão trofoblástica de 305,0 pg/mL. Esse ponto de corte fornece sensibilidade de 100,0%, especificidade de 85,0%, VPP de 76,9% e VPN de 100,0%. A área sob a curva é de 0,93.

5.4.2 β -hCG

Calculou-se por meio de curva *ROC* um ponto de corte para predição da invasão trofoblástica grau I considerando-se a concentração sérica de β -hCG (gráfico 3).

O valor de 2 516,3 mUI/mL apresenta 80,0% de sensibilidade, 95,0% de especificidade, 88,9% de valor preditivo positivo e 90,5% de valor preditivo negativo. A área sob a curva é de 0,96.

Gráfico 3 – Curva *ROC* para invasão trofoblástica grau I – β -hCG – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

5.5 PREDIÇÃO DE INVASÃO TROFOBLÁSTICA GRAU III

5.5.1 VEGF

Estabeleceu-se por meio de curva *ROC* (gráfico 4) que título sérico de VEGF de 425,9 pg/mL foi o melhor ponto de corte para predição de grau III de invasão trofoblástica. Esse ponto de corte fornece sensibilidade de 81,8%, especificidade de 94,7%, VPP de 90,0% e VPN de 90,0%. A área sob a curva é de 0,88.

Verificou-se que os casos com valores de VEGF acima de 425,9 pg/mL exibiam 81,0 vezes maior probabilidade de estarem classificados como grau III de invasão que os demais casos selecionados (IC 95% 7,7 – ∞).

A distribuição da população segundo classificação histológica, definida a partir dos pontos de corte obtidos por meio de curva *ROC*, está demonstrada na tabela 6.

Gráfico 4 – Curva *ROC* para invasão trofoblástica grau III – VEGF - HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Tabela 6 – Distribuição da população segundo classificação histológica e títulos de VEGF – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Títulos de VEGF (pg/mL)		
	< 305,0	305,0 a 425,9	> 425,9
I	10 (100,0%)	0	0
II	1 (11,1%)	7 (77,8%)	1 (11,1%)
III	2 (18,2%)	0	9 (81,8%)

5.5.2 β -hCG

Foi definido por meio de curva *ROC* (gráfico 5) que títulos séricos de β -hCG de 8 126,4 mUI/mL apresentam 81,8% de sensibilidade, 84,2% de especificidade, 75,0% de valor preditivo positivo e 88,9% de valor preditivo negativo para predição de invasão grau III (área sob a curva de 0,91). Os casos com títulos séricos de β -hCG maiores que 8 126,4 mUI/mL apresentavam maior probabilidade de serem classificados como grau III com OR = 24,0 (IC 95% = 3,6 – 155,0).

A distribuição da população segundo classificação histológica, definida a partir dos pontos de corte obtidos por meio de curva *ROC*, está demonstrada na tabela 7.

Gráfico 5 – Curva ROC para invasão trofoblástica grau III – β -hCG – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Tabela 7 – Distribuição da população segundo classificação histológica e títulos de β -hCG – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Títulos de β -hCG (mUI/mL)		
	< 2 516,3	2 516,3 a 8 126,4	> 8 126,4
I	8 (80,0%)	2 (20,0%)	0
II	1 (11,1%)	5 (55,6%)	3 (33,3%)
III	0	2 (18,2%)	9 (81,8%)

5.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

Baseado na relevância clínica e nos resultados estatísticos obtidos, foi realizado modelo de regressão logística incluindo ambos os fatores (concentrações séricas de VEGF e de β -hCG), objetivando-se comparar o desempenho das variáveis como fatores de predição da profundidade da invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina. A análise selecionou a concentração sérica de VEGF como fator de melhor desempenho na predição do grau de invasão trofoblástica na parede tubária (Tabela 8). Foi possível, ainda, a construção de curva de probabilidade do grau de invasão do tecido trofoblástico com a concentração sérica de VEGF (figura 4).

Tabela 8 – Concentração sérica de VEGF e predição do grau histológico de invasão do tecido trofoblástico – HCFMUSP – dez 2006 a set 2007

Grau de invasão trofoblástica	Fator	Estimativa	Erro padrão	P
Grau I	VEGF	-0,035	0,014	0,010*
	Constante	9,245	3,583	0,010
Grau III	VEGF	0,011	0,004	0,006*
	Constante	-4,882	1,657	0,003

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

Figura 4 – Curva de probabilidade de grau I ou III de invasão trofoblástica na gestação amparar de acordo com a concentração sérica de VEGF

Discussão 6

Os avanços da tecnologia ecográfica e dos recursos laboratoriais, principalmente a utilização de técnicas imunoenzimáticas, radioimunológicas e imunoenzimométricas que empregam anticorpos monoclonais e aumentam a sensibilidade e a especificidade na detecção das dosagens de β -hCG, possibilitam o diagnóstico cada vez mais precoce de GE. Desta forma, o enfoque da abordagem terapêutica da GE sofreu substancial mudança nas últimas décadas. Se, anteriormente, o objetivo do tratamento era retirar o produto conceptual implantado inadequadamente e preservar a vida da paciente com a realização de tratamento cirúrgico radical, atualmente, além da função precípua de outrora, pode-se, em casos selecionados, realizar terapêuticas mais conservadoras.

Os tratamentos conservadores, clínicos ou cirúrgicos, visam, principalmente, à manutenção do potencial reprodutivo dessas mulheres. Com essa lógica, a Sociedade de Ginecologia e Obstetrícia do Canadá defendia que a tuba uterina deveria ser sempre preservada, independentemente da integridade do oviduto ou do estado da tuba contralateral (Maternal Fetal Medicine Committee, 1987).

Estudos mostram que o tratamento clínico da GE, pela utilização do MTX ou pela conduta expectante, permite preservar a permeabilidade da tuba uterina após episódio de gestação tubária. Tanaka et al. (1982) são os primeiros a utilizar o MTX para o tratamento de paciente com GE intersticial e demonstram, por meio de histerossalpingografia, manutenção da permeabilidade tubária bilateral. Posteriormente, utilizando a mesma droga por

via intramuscular, outros pesquisadores observam sucesso terapêutico e permeabilidade tubária ipsilateral em 52,6% a 88% das pacientes com gestação tubária tratadas conservadoramente (Ichinoe et al., 1987; Sauer et al., 1987; Stovall et al., 1991; Stovall e Ling 1993; Debby et al. 2000; Erdem et al., 2004; Kirk et al., 2007). Resultados semelhantes são descritos por Feichtinger e Kemeter (1987; 1989), Pansky et al. (1989), Tulandi et al. (1992), Vauntraub et al. (1993), Pereira (1996), Darai et al. (1996) com a utilização de MTX local, injetado diretamente no saco gestacional implantado na tuba uterina.

Os resultados quanto à permeabilidade tubária em pacientes com GE submetidas à conduta expectante são semelhantes aos encontrados após tratamento medicamentoso com MTX. Pansky et al. (1991), Shalev et al. (1995a), Trio et al. (1995), Rantala e Makinen (1997), Elito Jr. et al. (2005), entre outros, estudam a permeabilidade tubária por meio de histerossalpingografia e/ou laparoscopia e descrevem que as tubas uterinas ipsilaterais permanecem patentes em 78% a 93% dos casos. Já o tratamento cirúrgico conservador (salpingostomia / salpingotomia) possibilita manutenção da permeabilidade tubária ipsilateral em 72% a 94% das pacientes (Vermesh et al., 1989; Fujishita et al., 2004).

Entretanto, dois fatos devem ser ressaltados para a avaliação desses resultados; primeiramente, a literatura médica não é concordante quanto à importância do tipo de tratamento instituído para o prognóstico reprodutivo da paciente com episódio prévio de GE. Aparentemente, a idade da paciente, o estado da tuba contralateral e o antecedente pessoal de infertilidade são os

fatores mais importantes para que se estabeleça a chance de gestação intra-uterina futura. Parece que o tipo de abordagem terapêutica realizada, independentemente da preservação da tuba uterina acometida, desempenha papel secundário nessa questão (Tuomivaara e Kauppila, 1988; Dubuisson et al., 1990; Pouly et al., 1991; Ory, 1993; Gruft et al., 1994; Dela Cruz e Cumming, 1997; Hajenius et al., 1997; Fernandez et al., 1998; Mol et al., 1998; Bouyer et al., 2000; Ego et al., 2001; Cabar et al., 2004; Gervaise et al., 2004; Hajenius et al., 2007). Com esta premissa, o Colégio Britânico de Obstetras e Ginecologistas adverte que, frente a casos em que tuba contralateral se apresente sadia, não há evidências que confirmem a realização de tratamento conservador ao invés da salpingectomia (RCOG, 2004). Em segundo lugar, a manutenção da permeabilidade tubária não garante preservação de sua função, visto que a tuba uterina não é estrutura rígida que exerce papel passivo no mecanismo reprodutivo. Mais do que simplesmente permitir o encontro dos gametas, as tubas mantidas após episódio de GE têm que exibir a capacidade de participar ativamente do transporte do embrião à cavidade uterina. Do contrário, a manutenção de estrutura anatômica não funcionando apenas aumenta o risco de novo episódio de GE (Pansky et al., 1993; Marana et al., 1995; Rantala e Makinen, 1997; Yao e Tulandi, 1997; Tay et al., 2000).

Green e Kott (1989) demonstram, por meio de análise histopatológica, que tubas uterinas tratadas conservadoramente após episódio de GE podem exibir lesões estruturais (focos persistentes de transformação decidual, divertículos ou alterações pós-inflamatórias) capazes de prejudicar a função tubária e, conseqüentemente, o futuro reprodutivo dessas pacientes. Assim, a

pesquisa de fatores que possam permitir a seleção de casos em que a lesão tubária seja mínima a ponto de não comprometer sua função é de grande interesse assistencial.

No presente estudo, realizou-se investigação da invasão do tecido trofoblástico implantado na tuba uterina; por ser estrutura anatômica com diferenças histológicas entre seus diversos segmentos, principalmente no que concerne à espessura da camada muscular, acredita-se que uma possível invasão do tecido trofoblástico na intimidade de sua parede dar-se-ia de maneira distinta em cada um desses segmentos (intersticial, ístmico, ampular e fímbrias). Optou-se pelo estudo da invasão do trofoblasto exclusivamente nas gestações ampulares por representarem mais de 70% das GE tubárias. Na presente investigação, observou-se que o trofoblasto atingiu pelo menos a camada muscular em 66,7% dos casos; esse achado é concordante com a maioria dos artigos publicados que também relata que o tecido trofoblástico é freqüentemente encontrado além da camada mucosa da tuba uterina (Budowick et al., 1980; Randall et al., 1987; Dietl et al., 1988; Green e Kott, 1989; Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006).

Estes dados de literatura permitem inferir que o trofoblasto freqüentemente invade o espaço intersticial e os vasos tubários, e é comum o desenvolvimento do tecido trofoblástico em camadas mais profundas da tuba uterina, provavelmente pela ausência da reação decidual, própria do endométrio. Nota-se que a vascularização do tecido extra-uterino onde ocorre a implantação da gestação ectópica é muito diferente daquela presente no

endométrio. As condições teciduais locais no sítio de implantação ectópico provocam maior produção de VEGF (Ladoux e Frelin, 1993; Lam et al., 2004). A análise da expressão do RNA mensageiro do VEGF e de seus receptores (KDR e flt-1) nos sítios de implantação do saco gestacional ectópico em tubas uterinas humanas, comparados com os locais da tuba onde não houve implantação, sugere que o VEGF seria o fator angiogênico responsável pela implantação da GE nestes sítios.

No presente estudo, correlacionou-se a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária com as concentrações séricas maternas de VEGF; a hipótese era de que, quanto maior a produção celular de VEGF, mais profunda seria a invasão das células trofoblásticas na parede da tuba uterina. Além disso, objetivou-se investigar a possibilidade de predição do grau de invasão em situações de gestações ampulares para que o método possa auxiliar na prática clínica. A proposta é fornecer ao clínico dados que possam colaborar na tomada de decisões, que permitam definir estratégias para melhor abordagem terapêutica: conservadora ou radical. Dessa forma, o estudo dos títulos séricos vislumbra melhor aplicação prática que a análise de concentrações teciduais locais de VEGF, o que demandaria a remoção do órgão comprometido.

Na população investigada, 33,3% das pacientes apresentaram invasão trofoblástica até a mucosa da tuba uterina, 30% tiveram invasão até camada muscular e os demais 36,7% apresentaram invasão de toda a espessura da parede tubária. Esta distribuição percentual é diferente da observada em estudo prévio realizado (Cabar et al., 2006), quando se observou que 43,8% da amostra apresentou invasão trofoblástica até serosa tubária. Ressalta-se que os estudos foram conduzidos em diferentes épocas; atualmente, ultrasonografia transvaginal é realizada de maneira sistemática em qualquer paciente com sangramento genital que procure o Pronto Socorro do HCFMUSP no primeiro trimestre da gestação, o que possibilita diagnóstico mais precoce dos casos de GE. Este fato pode explicar a maior proporção de casos em que a invasão trofoblástica esteve limitada à mucosa tubária. Outro fato que deve ser valorizado é a diferença no número de pacientes incluídas em cada estudo: 105 mulheres na amostra anterior contra 30 gestantes na presente investigação.

Semelhante aos resultados obtidos por Natale et al. (2003) e Cabar et al. (2006), o presente estudo evidenciou que a média da idade gestacional das pacientes não foi diferente de acordo com os diversos graus de invasão trofoblástica. Em casos de GE, a idade gestacional só pode ser aferida a partir da data da última menstruação, já que não é possível sua confirmação por meio de ultra-sonografia. O desconhecimento da data precisa, bem como a ocorrência de irregularidades menstruais, dificultam, muitas vezes, o cálculo da idade gestacional exata. Por outro lado, a duração do atraso menstrual no momento do diagnóstico não reflete, necessariamente, o período em que o

trofoblasto permaneceu viável, com potencial capacidade de invasão. Dessa forma, a idade gestacional no momento do diagnóstico não foi critério de inclusão na presente investigação.

Optou-se por incluir no estudo apenas gestações concebidas espontaneamente. Fasouliotis et al. (2004) demonstram que, também em gestações concebidas por auxílio de FIV, existem diferenças nas concentrações de VEGF entre gestações tópicas e ectópicas; entretanto, não existem estudos que comparem os títulos séricos de VEGF em GE concebidas espontaneamente daquelas que ocorrem após tratamentos de reprodução assistida.

Para a realização da dosagem de VEGF foram utilizados métodos rigorosos que permitiram obtenção de resultados extremamente confiáveis. Devem ser destacados alguns pontos: após a confirmação do diagnóstico de GE, realizava-se coleta de amostra de sangue que era posteriormente encaminhada pelo próprio pesquisador responsável pelo estudo para o laboratório de Pleura do Instituto do Coração do HCFMUSP. Esta amostra era centrifugada em menos de 24 horas, pois após este período ocorreria degranulação de plaquetas e liberação de VEGF para o soro, o que poderia interferir nos resultados. O soro centrifugado foi então armazenado e posteriormente foi realizada dosagem em triplicata de cada amostra de sangue. A média das três dosagens foi utilizada para análise estatística, aumentando, desta forma, a precisão dos resultados.

Ainda com relação aos métodos adotados no presente estudo, a utilização de técnicas de coloração histológica específicas para identificação de tecido muscular (Masson) e de tecido trofoblástico (imunohistoquímica para hPL) também possibilitaram maior acurácia na determinação da classificação histológica de cada caso estudado. Em estudo prévio de Cabar et al. (2006), assim como nos demais trabalhos científicos disponíveis acerca do tema, a análise histopatológica foi realizada com cortes histológicos corados apenas pela coloração de hematoxilina-eosina.

Alguns estudos já haviam demonstrado que os títulos séricos de VEGF são maiores em pacientes com GE quando comparados com aqueles dosados no soro de mulheres com gestações tópicas, independentemente da viabilidade do tecido trofoblástico tópico (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002; Mueller et al., 2004; Daponte et al., 2005; Cabar et al., 2007b). De acordo com estes autores, as condições de oxigenação tecidual inadequadas para o desenvolvimento embrionário que podem ser verificadas nas tubas uterinas provocariam incremento na produção e secreção de VEGF na tentativa de aumentar a angiogênese local e, conseqüentemente, melhorar a oxigenação tecidual e as condições para o desenvolvimento do tecido trofoblástico ectópico.

Não existem estudos prévios que correlacionem a concentração sérica de VEGF com a profundidade da invasão do tecido trofoblástico na parede tubária. No presente estudo, confirmando a hipótese formulada, observou-se que maiores concentrações séricas de VEGF estiveram relacionadas com maior profundidade de invasão do tecido trofoblástico. Possivelmente, quanto maior a produção de VEGF, maior a angiogênese tecidual procurando adaptar as condições locais para a invasão do tecido trofoblástico na parede da tuba uterina.

As concentrações séricas de VEGF também possibilitaram a predição da profundidade da invasão do trofoblasto. Título sérico de 305,0 pg/mL forneceu 100% de sensibilidade, 85% de especificidade e 100 % de valor preditivo negativo para detecção de profundidade grau I. Isto significa que em nenhum caso no qual a invasão trofoblástica ocorreu até mucosa tubária a concentração sérica de VEGF foi maior que 305,0 pg/mL. Esta informação possibilita ao clínico, na prática, selecionar as pacientes que se beneficiariam de conduta conservadora, pois tuba com menor dano histológico estaria sendo preservada. Por outro lado, títulos séricos de 425,9 pg/mL possibilitaram predição de invasão total da parede tubária com 81,8% de sensibilidade, 94,7% de especificidade, 90% de valor preditivo positivo e negativo. Na amostra estudada, 81,8% das pacientes que apresentavam tubas uterinas completamente invadidas pelo tecido trofoblástico tinham títulos séricos de VEGF maiores que 425,9 pg/mL; os casos que apresentaram níveis séricos desta substância acima deste valor de corte apresentaram 81 vezes mais chance de terem invasão trofoblástica mais profunda que os demais casos. Isto

indica que o clínico poderia, nestes casos, indicar salpingectomia visando à eliminação de estrutura anatômica lesada. A tentativa de preservação de estruturas extensivamente danificadas poderia dificultar nova gestação e possibilitar recorrência de gestação tubária.

Do ponto de vista assistencial, para nortear o tipo de tratamento a ser oferecido (conservador ou radical), torna-se mais interessante poder esclarecer dois aspectos: (i) se a invasão é superficial ou não; (ii) se a invasão é completa ou não. Ao se verificar maior probabilidade de invasão superficial, o tratamento conservador é aceitável. Caso contrário, na probabilidade maior de invasão profunda, o tratamento cirúrgico radical pela salpingectomia seria a conduta mais recomendada. A predição de invasão trofoblástica parcial (classificação grau II) torna-se de pouca utilidade na condução dos casos.

Estudos prévios relacionam as concentrações séricas de β -hCG com a profundidade de invasão do trofoblasto na parede de tubas uterinas acometidas por gestações ampulares e observam que títulos mais elevados deste hormônio se relacionam com maior profundidade de penetração do trofoblasto (Oktay et al., 1994; Klein et al., 1995b; Natale et al., 2003; Cabar et al., 2006). Outrossim, esses dados estão de acordo com observações prévias de que a completa erradicação do tecido trofoblástico em GE tratadas conservadoramente, por salpingostomia, é mais difícil em pacientes que apresentam maiores concentrações de β -hCG, sendo encontradas maiores taxas de GE persistente nessas mulheres (Lundorff et al., 1991; Hagstrom et al., 1994a; Hagstrom et al., 1994b; Milad et al., 1998).

Da mesma maneira, a literatura concernente mostra que a chance de sucesso do tratamento conservador com MTX é maior nos casos que apresentam menores concentrações da β -hCG, inclusive com maior probabilidade de manutenção da permeabilidade tubária após resolução da GE (Kooi e Kock, 1992; Shalev et al., 1995b; Corsan et al., 1995; Pereira, 1996; Stika et al., 1996; Saraj et al., 1998; Elito Jr. et al., 1999; Lipscomb et al., 1999; Elito Jr. et al., 2005). A maioria desses estudos mostra que o sucesso do tratamento com MTX é superior a 90% no grupo de pacientes em que a concentração sérica da β -hCG é inferior a 5 000 mUI/mL. Lipscomb et al. (1999), acompanhando 350 pacientes tratadas com dose única de MTX, demonstram que a taxa de sucesso é superior a 98% sempre que os títulos hormonais são inferiores a 1 000 mUI/mL. Latchaw et al. (2005) observam que concentrações séricas acima de 5 000 mUI/mL exibem maior chance de rotura da tuba acometida por GE (OR 1,9; IC 95% 1,1 – 3,1). No que tange à permeabilidade tubária, Elito Jr. et al. (2005) relatam que pacientes tratadas com MTX com títulos de β -hCG acima desse valor apresentam 11,8 vezes mais chance de evoluírem com obstrução da tuba uterina após o tratamento (IC 95% 2,3 – 61,3).

Cabar et al. (2006), estudando 105 casos de gestações ampulares submetidas a salpingectomia, mostram que a concentração sérica de β -hCG é a melhor preditora da profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária. Neste estudo, observou-se que as pacientes com título sérico de β -hCG inferior a 2 400 mUI/mL apresentaram 28,4 vezes maior probabilidade de estarem

classificadas como grau I de invasão com relação aos demais casos estudados (IC 95% 8,9 – 90,1). Da mesma forma, os casos com concentrações séricas de β -hCG superiores a 5 990 mUI/mL exibiram 13,9 vezes maior probabilidade de estarem classificados como grau III de invasão (IC 95% 5,3 – 36,4).

Outros pesquisadores encontraram valores de β -hCG muito semelhantes para a predição da profundidade da invasão do trofoblasto. Oktay et al., em estudo publicado em 1994, afirmam que o valor de β -hCG sérica de 5 400 mUI/mL apresenta 89% de valor preditivo positivo e 94% de valor preditivo negativo para determinação da invasão do trofoblasto na camada muscular da tuba uterina. Natale et al., em estudo de 2003, observam que todas as pacientes com concentração sérica desse hormônio superior a 6 000 mUI/mL apresentam invasão trofoblástica até, pelo menos, a camada muscular da tuba uterina. Por outro lado, apenas 35% das pacientes com invasão tecidual até subserosa da tuba têm concentração de β -hCG inferior a 1 500 mUI/mL.

Levando-se em consideração estas evidências de que a concentração sérica de β -hCG é bom preditor da profundidade de invasão trofoblástica, foi comparado o desempenho da concentração sérica de VEGF com o da β -hCG. Para que a análise do desempenho desses marcadores fosse realizada com dados obtidos numa mesma população, calcularam-se também os pontos de corte e respectivos valores de sensibilidade e especificidade para predição de grau I e grau III de invasão do trofoblasto para a concentração da β -hCG. O valor de 2 516,3 mUI/mL foi o melhor ponto de corte para predição de invasão grau I, com 80% de sensibilidade e 95% de especificidade. Da mesma maneira,

concentração sérica de 8 126,4 mUI/mL foi considerado melhor ponto de corte para predição de invasão grau III.

Estudo realizado com método semelhante, em 2006 (Cabar et al.), mostra que o ponto de corte para predição grau I é 2 400 mUI/mL, valor muito próximo ao encontrado na presente investigação (2 516,3 mUI/mL). Com relação a predição do grau III, no estudo anterior o melhor ponto de corte para invasão grau III foi 5 990 mUI/mL (8 126,4 mUI/mL na presente investigação). Ressalta-se que a amostra anterior foi composta de 105 casos, o que pode explicar tal discrepância com relação a estes valores.

Finalmente, na comparação de desempenho, a concentração sérica de VEGF mostrou ser melhor preditora da profundidade de invasão do trofoblasto na tuba uterina. Entretanto, alguns fatos devem ser ressaltados; a dosagem da concentração sérica de β -hCG é exame já incorporado ao arsenal diagnóstico de grande parte dos serviços médicos de urgência. Apresenta-se como teste de fácil e rápida execução, além de ter custo baixo. Em contrapartida, a dosagem da concentração sérica de VEGF não está disponível, ainda, na maioria dos hospitais e laboratórios de análises clínicas do Brasil. Este fato, sem dúvida alguma, encarece sua realização e dificulta a introdução deste exame na rotina propedêutica.

Esta investigação, apesar de ter sido realizada com grupo limitado de mulheres, apresenta resultados encorajadores. Os títulos séricos maternos de VEGF, juntamente com demais dados clínicos e laboratoriais, efetivamente podem auxiliar o clínico na decisão pela forma de abordagem terapêutica em pacientes com gestação ampular e desejo reprodutivo. As concentrações séricas de VEGF parecem estar aumentadas em mulheres portadoras de gestação tubária e a dosagem destes títulos séricos poderia auxiliar não apenas no diagnóstico de GE, mas também na decisão do tipo de tratamento a ser oferecido de acordo com o desejo reprodutivo dessas mulheres. A realização de tratamento conservador após GE só se justifica nas situações em que a manutenção da tuba uterina não representa risco adicional para a paciente que deseja engravidar no futuro.

Conclusões 7

***“Todo pasa y todo queda,
pero lo nuestro es pasar.
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.”***

(Antonio Machado)

O presente estudo permitiu concluir que:

1) A profundidade da penetração do tecido trofoblástico na parede tubária acometida por GE ampulares se relaciona com a concentração sérica de VEGF.

2) A concentração sérica de VEGF é preditora da profundidade da invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina acometida por gestação ampular.

3) A concentração sérica de VEGF apresenta melhor desempenho que a concentração sérica de β -hCG como preditora da profundidade da invasão do trofoblasto na parede da tuba uterina acometida por gestação ampular.

Referências 8

- Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994; 118:445-50.
- Afzelius BA, Camner P, Mossberg B. On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil Steril*. 1978; 29:72-4.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 94: Medical management of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2008; 111:1479-85.
- Armitage PB. Regression and Correlation. In: Armitage PB, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. 4th ed. Oxford: Blackwell; 2001.
- Bakken IJ, Skjeldestad FE, Nordbø SA. Chlamydia trachomatis infections increase the risk for ectopic pregnancy: a population-based, nested case-control study. *Sex Transm Dis*. 2007a; 34:166-9.
- Bakken IJ, Skjeldestad FE, Lydersen S, Nordbø SA. Births and ectopic pregnancies in a large cohort of women tested for Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Dis*. 2007b; 34:739-43.
- Bakken IJ. Chlamydia trachomatis and ectopic pregnancy: recent epidemiological findings. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21:77-82.
- 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.

- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998; 125:1591-8.
- Bjartling C, Osseir S, Persson K. The frequency of salpingitis and ectopic pregnancy as epidemiologic markers of *Chlamydia trachomatis*. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000; 79:123-8.
- Blyth M, Wellesley D. Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia. *J Obstet Gynaecol*. 2008; 28:358.
- *Obstet Gynecol*. 1999; 94: 583-7.
- Bouyer J, Job-Spira N, Pouly JL, Coste J, Germain E, Fernandez H. Fertility following radical, conservative-surgical or medical treatment for tubal pregnancy: a population-based study. *BJOG*. 2000; 107:714-21.
- 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; 17:3224–30.
- Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly JL, Fernandez H, Gerbaud L, Job-Spira N. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol*. 2003; 157:185-94.
- Budowick M, Johnson TR Jr, Genadry R, Parmley TH, Woodruff JD. The histopathology of the developing tubal ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1980; 34:169-71.
- Cabar FR, Pereira PP, Zugaib M. Prognóstico reprodutivo após episódio de gestação tubária. *Femina*. 2004; 32:381-6.

- Cabar FR, Pereira PP, Schultz R, Zugaib M. Predictive factors of trophoblastic invasion into the ampullary region of the tubal wall in ectopic pregnancy. *Hum Reprod*. 2006; 21:2426-31.
- Cabar FR, Pereira PP, Zugaib M. Intrauterine pregnancy after salpingectomy for tubal pregnancy due to emergency contraception: a case report. *Clinics*. 2007a; 62:641-2.
- Cabar FR, Pereira PP, Zugaib M. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sérico como marcador de gestação tubária. *Anais do XII Congresso de Obstetrícia e Ginecologia da SOGESP*. 2007b.
- Cabar FR. Gestação tubária após reprodução assistida. *Arquivos H Ellis*. 2007; 4:9-13.
- Cabar FR. Síndromes hemorrágicas da primeira metade da gestação. In: Cabar FR. *Principais temas em Obstetrícia para Residência Médica*. 1ª ed. São Paulo: Medcel Editora e Eventos. 2008; p. 65-76.
- Cabar FR, Feetback PB, Pereira PP, Zugaib M. Serum markers in tubal pregnancy diagnosis. *Clinics*. 2008; 63:701-8
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380:435-9.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407:249-57.

- Cartwright PS. Incidence, epidemiology, risk factors and etiology. In: Stovall TG, Ling FW (eds). Extrauterine pregnancy: clinical diagnosis and management. Nova Iorque: McGraw-Hill; 1993; p.27-63.
- Centers for Disease Control and Prevention. Ectopic Pregnancy – United States, 1990-1992. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1995; 44: 46-8.
- Chang J, Elam-Evans LD, Berg CJ, Herndon J, Flowers L, Seed KA, Syverson CJ. Pregnancy-related mortality surveillance - United States, 1991—1999. MMWR Surveill Summ. 2003; 52:1-8.
- Chow WH, Daling JR, Cates W, Greenberg RS. Epidemiology of ectopic pregnancy. Epidemiol Rev. 1987; 9:70-94.
- Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors fit and KDR in human placenta throughout pregnancy. Hum Reprod. 1996; 11:1090-8.
- Comitê Central de Mortalidade Materna – Prefeitura Municipal de São Paulo. Relatório do Estudo de Casos de Mortalidade Materna no Município de São Paulo durante o biênio 2003/2004 [Internet]. Disponível em:
<http://ww2.prefeitura.sp.gov.br//arquivos/secretarias/saude/mulher/0007/RelMortMaterna0304>.
- Cooper BC, Ritchie JM, Broghammer CL, Coffin J, Sorosky JI, Buller RE, Hendrix MJ, Sood AK. Preoperative serum vascular endothelial growth factor levels: significance in ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2002; 8:3193-7.

- Corsan GH, Karacan M, Qasim S, Bohrer MK, Ransom MX, Kemmann E. Identification of hormonal parameters for successful systemic single-dose methotrexate therapy in ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 1995; 10:2719-22.
- Coste J, Job-Spira N, Fernandez H, Papiernik E, Spira A. Risk factors for ectopic pregnancy: a case-control study in France, with special focus on infectious factors. *Am J Epidemiol.* 1991; 133:839-49.
- Coste J, Bouyer J, Job-Spira N. Epidemiology of ectopic pregnancy: incidence and risk factors. *Fertile Contraception Sexualite.* 1996; 24:135-9.
- Critoph FN, Dennis KJ. The cellular composition of the human oviduct epithelium. *Br J Obstet Gynaecol.* 1977; 84:219-21.
- Crowhurst JA, Plaat F. Why mothers die - report on confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom 1994-96. *Anaesthesia.* 1999; 54:207-9.
- Cubo T, Padilla D, de la Osa G, Palomino T, García M, Pardo R, Martín J, Arévalo E, Hernández J. Serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and its prognostic significance. *Med Clin (Barc).* 2004; 122:201-4.
- Cunningham G, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap LC, Wenstrom KD. Ectopic pregnancy. In: Cunningham G, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap LC, Wenstrom KD (eds). *Williams Obstetrics.* 22nd ed. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2005; p.253-72.

- Daponte A, Pournaras S, Zintzaras E, Kallitsaris A, Lialios G, Maniatis AN, Messinis IE. The value of a single combined measurement of VEGF, glycodeclin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Hum Reprod.* 2005; 20:3163-6.
- Daniel Y, Geva E, Lerner-Geva L, Eshed-Englender T, Gamzu R, Lessing JB, Bar-Am A, Amit A. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with ectopic pregnancy: is this a novel marker? *Fertil Steril.* 1999; 72:1013-7.
- Darai E, Benifla JL, Naouri M, Pennehouat G, Guglielmina JN, Deval B, Filippini F, Crequat J, Madelenat P. Transvaginal intratubal methotrexate treatment of ectopic pregnancy. Report of 100 cases. *Hum Reprod.* 1996; 11:420-4.
- Debby A, Golan A, Sadan O, Zakut H, Glezerman M. Fertility outcome following combined methotrexate treatment of unruptured extrauterine pregnancy. *BJOG.* 2000; 107: 626-30.
- Dela Cruz A, Cumming D. Factors determining fertility after conservative or radical surgical treatment for ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 1997; 68:871-4.
- Department of Health. Why mothers die: report on confidential enquires into maternal death in the United Kingdom 1994-1995. RCOG Press; (November) 1998.
- Dietl J, Buchholz F, Kindler PA. Histopathology of tubal pregnancy. *Int J Gynecol Obstet.* 1988; 27:385-8.

- Dubuisson JB, Aubriot FX, Foulot H, Bruel D, Bouquet de Joliniere J, Mandelbrot L. Reproductive outcome after laparoscopic salpingectomy for tubal pregnancy. *Fertil Steril*. 1990; 53:1004-7.
- Egger M, Low N, Smith GD, Lindblom B, Herrmann B. Screening for chlamydial infections and the risk of ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis. *BMJ*. 1998; 316:1776-80.
- Ego A, Subtil D, Cosson M, Legoueff F, Houfflin-Debarge V, Querleu D. Survival analysis of fertility after ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2001; 75:560-6.
- Elito Júnior J, Reichmann AP, Uchiyama MN, Camano L. Predictive score for the systemic treatment of unruptured ectopic pregnancy with a single dose of methotrexate. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999; 67:75-9.
- Elito Júnior J, Han KK, Camano L. Values of β -human chorionic gonadotropin as a risk factor for tubal obstruction after tubal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005; 84:864-7.
- Erdem M, Erdem A, Arslan M, Oç A, Biberoğlu K, Gürsoy R. Single-dose methotrexate for the treatment of unruptured ectopic pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2004; 270:201-4.
- Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmound C. A longitudinal study of maternal serum vascular growth factor in early pregnancy. *Hum Reprod*. 1998; 13:1057-62.
- Fasouliotis SJ, Spandorfer SD, Witkin SS, Liu HC, Roberts JE, Rosenwaks Z. Maternal serum vascular endothelial growth factor levels in early ectopic and intrauterine pregnancies after in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*. 2004; 82:309-13.

- Feichtinger W, Kemeter P. Conservative treatment of ectopic pregnancy by transvaginal aspiration under sonographic control and MTX injection. *Lancet*. 1987; 1:381-92.
- Feichtinger W, Kemeter P. Treatment of unruptured ectopic pregnancy by needling of sac and injection of methotrexate or PG E2 under transvaginal sonography control. Report of 10 cases. *Arch Gynecol Obstet*. 1989; 246:85-9.
- Felemban A, Sammour A, Tulandi T. Serum vascular endothelial growth factor as a possible marker for early ectopic pregnancy. *Hum Reprod*. 2002; 17:490-2.
- Fernandez H, Coste J, Job-Spira N. Controlled ovarian hyperstimulation as a risk factor for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1991; 78:656-9.
- Fernandez H, Marchal L, Vincent Y. Fertility after radical surgery for tubal pregnancy. *Fertil Steril*. 1998; 70:680-6.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992; 13:18-32.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004; 25:581-611.
- Fujishita A, Masuzaki H, Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Ishimaru T. Laparoscopic salpingotomy for tubal pregnancy: comparison of linear salpingotomy with and without suturing. *Hum Reprod*. 2004; 19:1195-200.

- Gasser RF, Peppler RD. Anatomy, histology and embryology of the fallopian tubes. In: Langer A, Iffy L, editores. Extrauterine pregnancy. Littleton: PSG Publishing; 1986.
- Gervaise A, Masson L, de Tayrac R, Frydman R, Fernandez H. Reproductive outcome after methotrexate treatment of tubal pregnancies. *Fertil Steril*. 2004; 82:304-8.
- Green LK, Kott ML. Histopathologic findings in ectopic tubal pregnancy. *Int J Gynecol Pathol*. 1989; 8:255-62.
- Gruft L, Bertola E, Luchini L, Azzilonna C, Bigatti G, Parazzini F. Determinants of reproductive prognosis after ectopic pregnancy. *Hum Reprod*. 1994; 9:1333-6.
- Hair Jr. JF, Black B, Babin B, Anderson RE, Tatham RL. Multivariate data analysis. 6th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2005; 928 p.
- Hajenius PJ, Engelsbel S, Mol BW, Van der Veen F, Ankum WM, Bossuyt PM, Hemrika DJ, Lammes FB. Randomised trial of systemic methotrexate versus laparoscopic salpingostomy in tubal pregnancy. *Lancet*. 1997; 350:774-9.
- Hajenius PJ, Mol F, Mol BW, Bossuyt PM, Ankum WM, van der Veen F. Interventions for tubal ectopic pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(1):CD000324.
- Halbert SA, Tam PY, Blandau RJ. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science*. 1976; 191:1052-3.
- Halbert SA, Becker DR, Szal SE. Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod*. 1989; 40:1131-6.

- Hagstrom HG, Hahlin M, Bennegard-Eden B, Sjoblom P, Thorburn J, Lindblom B. Prediction of persistent ectopic pregnancy after laparoscopic salpingostomy. *Obstet Gynecol.* 1994a; 84:798-802.
- Hagstrom HG, Hahlin M, Sjoblom P, Lindblom B. Prediction of persistent trophoblastic activity after local prostaglandin F₂ alpha injection for ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 1994b; 9:1170-4.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002; 2:289-300.
- Hosmer Jr. DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression, Textbook and Solutions Manual.* 2nd ed. Nova Iorque: Wiley Publishers; 2001.
- Ichinoe K, Wake N, Shinkai N, Shiina Y, Miyazaki Y, Tanaka T. Nonsurgical therapy to preserve oviduct function in patients with tubal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 156:484-7.
- Jansen RP. Endocrine response in the Fallopian tube. *Endocr Rev.* 1984; 5:525-51.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in-vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:10242-7.
- Job-Spira, Collet P, Coste J, Brémont A, Lauman B. Risk factors for ectopic pregnancy. Results of a case-control study in the Rhone-Alpes region. *Contracept Fertil Sex.* 1993; 21:307-12.

- Kirk E, Condous G, Van Calster B, Haider Z, Van Huffel S, Timmerman D, Bourne T. A validation of the most commonly used protocol to predict the success of single-dose methotrexate in the treatment of ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2007; 22:858-63.
- Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7:259-70.
- Klein M, Graf A, Kiss H, Czerwenka K, Beck A, Egarter C, Husslein P. The relation between depth of trophoblastic invasion and beta-hCG levels in tubal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 1995a; 256:85-8.
- Klein M, Graf AH, Hutter W, Hacker GW, Beck A, Staudach A, Kiss H, Egarter C, Husslein P. Proliferative activity in ectopic trophoblastic tissue. *Hum Reprod.* 1995b; 10:2441-4.
- Kooi S, Kock HC. A review of the literature on nonsurgical treatment in tubal pregnancies. *Obstet Gynecol Surv.* 1992; 47:739-49.
- Kucera-Sliutz E, Schiebel I, König F, Leodolter S, Sliutz G, Koelbl H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and discrimination between abnormal intrauterine and ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2002; 17:3231-4.
- Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195:1005-10.
- Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Leung SW, Cheung LP, Haines C. Increased messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the implantation site of the human oviduct with ectopic gestation. *Fertil Steril.* 2004; 82:686-90.

- Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*. 1998; 55:29-42.
- Latchaw G, Takacs P, Gaitan L, Geren S, Burzawa J. Risk Factors Associated with the rupture of tubal ectopic pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*. 2005; 60:177-80.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9.
- Lewis G, Drife J (eds). "Why Mothers Die", Triennial Report 2000-2002. In: The Sixth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. RCOG Press; (November) 2004.
- Lipscomb GH, McCord ML, Stovall TG, Huff G, Portera SG, Ling FW. Predictors of success of methotrexate treatment in women with tubal ectopic pregnancies. *N Engl J Med*. 1999; 341:1974-8.
- Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of Human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:363-72.
- Lundorff P, Hahlin M, Sjoblom P, Lindblom B. Persistent trophoblast after conservative treatment of tubal pregnancy: prediction and detection. *Obstet Gynecol*. 1991; 77:129-33.
- Marana R, Muzii L, Rizzi M, dell'Acqua S, Mancuso S. Prognostic role of laparoscopic salpingoscopy of the only remaining tube after contralateral ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1995; 63:303-6.

- Marchbanks PA, Annegers JF, Coulam CB, Strathy JH, Kurland LT. Risk factors for ectopic pregnancy. A population-based study. *JAMA*. 1988; 259:1823-7.
- Maternal Fetal Medicine Committee of The Society of Obstetrician and Gynecologists of Canada. Ectopic Pregnancy. *Bull Soc Obstet Gynecol Can*. 1987; Jan-Feb: 7-13.
- McComb P, Langley L, Villalon M, Verdugo P. The oviductal cilia and Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*. 1986; 46:412-6.
- Milad MP, Klein E, Kazer RR. Preoperative serum hCG level and intraoperative failure of laparoscopic linear salpingostomy for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1998; 92:373-6.
- Mol BW, Ankum WM, Bossuyt PM, van der Veen F. Contraception and the risk of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Contraception*. 1995; 52:337-41.
- Mol BW, Matthijsse HC, Tinga DJ, Huynh T, Hajenius PJ, Ankum WM, Bossuyt PM, van der Veen F. Fertility after conservative and radical surgery for tubal pregnancy. *Hum Reprod*. 1998; 13:1804-9.
- Moromizato Y, Stechschulte S, Miyamoto K, Murata T, Tsujikawa A, Joussen AM, Adamis AP. CD18 and ICAM-1-dependent corneal neovascularization and inflammation after limbal injury. *Am J Pathol*. 2000; 157:1277-81.
- 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.

- Nakagawa K, Chen YX, Ishibashi H, Yonemitsu Y, Murata T, Hata Y, Nakashima Y, Sueishi K. Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26:61-6.
- Natale A, Candiani M, Merlo D, Izzo S, Gruff L, Busacca M. Human chorionic gonadotropin level as a predictor of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ectopic pregnancy: a blinded study. *Fertil Steril.* 2003; 79:981-6.
- NCHS. Advanced report of final mortality statistics – 1992. Hyattsville: US Department of Health and Human Services, Public Health Services, CDC; 1994; 43.
- Neme B, Pereira PP, Zugaib M. Prenhez ectópica. In: Neme B. *Obstetrícia Básica*. 3ª ed. São Paulo: Sarvier. 2006; p. 372-94.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endometrial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9-22.
- Oktay K, Brzyski RG, Miller EB, Krugman D. Association of serum β -hCG levels with myosalpingeal invasion and viable trophoblast mass in tubal pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1994; 84:803-6.
- Ory SJ. Fertility after ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 1993; 60:231-35.
- Pansky M, Bukovsky J, Golan A, Weinraub R, Schneider D, Langer R, Arieli S, Caspi E. Tubal patency after local methotrexate injection for tubal pregnancy. *Lancet.* 1989; 2:967-73.
- Pansky M, Golan A, Bukovsky J, Caspi E. Nonsurgical management of tubal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164:888-95.

- Pansky M, Bukovsky J, Golan A, Avrech O, Langer R, Weinraub Z, Caspi E. Reproductive outcome after laparoscopic local methotrexate injection for tubal pregnancy. *Fertil Steril*. 1993; 60:85-7.
- Parazzini F, Ferraroni M, Tozzi L, Ricci E, Mezzopane R, La Vecchia C. Induced abortions and risk of ectopic pregnancy. *Hum Reprod*. 1995; 10:1841-4.
- Peppler RD, Thompson CC. Anatomy, Embryology and Physiology of the Fallopian Tube. In: Stovall TG, Ling FW (eds). *Extrauterine pregnancy: clinical diagnosis and management*. Nova Iorque: McGraw-Hill; 1993; p. 9-26.
- Pereira PP. Tratamento da prenhez tubária íntegra por injeção única de metotrexato no saco gestacional ectópico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1996.
- Pereira PP, Cabar FR, Raiza LC, Roncaglia MT, Zugaib M. Emergency contraception and ectopic pregnancy: report of 2 cases. *Clinics*. 2005; 60:497-500.
- Pereira PP. Gravidez ectópica. In: Zugaib M, Bittar RE. *Protocolos assistenciais da Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da USP*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 437-43.
- Pereira PP, Cabar FR, Schultz R, Zugaib M. Ultrasound image and trophoblastic invasion into the tubal wall in ampullary pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008; no prelo.

- Pouly JL, Chapron C, Manhes H, Canis M, Wattiez A, Bruhat MA. Multifactorial analysis of fertility after conservative laparoscopic treatment of ectopic pregnancy in a series of 223 patients. *Fertil Steril*. 1991; 56:453-60.
- Pulkkinen MO, Talo A. Tubal physiologic consideration in ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 1987; 30:164-9.
- Randall S, Buckley CH, Fox H. Placentation in the fallopian tube. *Int J Gynecol Pathol*. 1987; 6:132-9.
- Rantala M, Makinen J. Tubal patency and fertility outcome after expectant management of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1997; 68:1043-6.
- RCOG. Why mothers die 1997-1999: the fifth report of the confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom 1997-1999. London: RCOG Press, 2001.
- RCOG. The management of tubal pregnancy. Guideline nº 21. London: RCOG Press, 2004.
- Rezende J. Prenhez ectópica. In: Rezende J. *Obstetrícia*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 776-808.
- Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44:3578-85.
- Saraj AJ, Wilcox JG, Najmabadi S, Stein SM, Johnson MB, Paulson RJ. Resolution of hormonal markers of ectopic gestation: a randomized trial comparing single dose methotrexate with salpingostomy. *Obstet Gynecol*. 1998; 92:989-94.

- Sauer MV, Gorrill MJ, Rodi IA, Yeko TR, Greenberg LH, Bustillo M, Gunning JE, Buster JE. Nonsurgical management of unruptured ectopic pregnancy: an extended clinical trial. *Fertil Steril*. 1987; 48:752-5.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219:983-5.
- Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*. 1990; 50:1774-8.
- Shalev E, Romano S, Peleg D, Bustan M, Tsabari A. Spontaneous resolution of ectopic pregnancy: natural history. *Fertil Steril*. 1995a; 63:15-9.
- Shalev E, Peleg D, Bustan M, Romano S, Tsabari A. Limited role for intratubal methotrexate treatment of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1995b; 63:20-4.
- Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:3112-8.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359:843-5.

- Stika CS, Anderson L, Frederiksen MC. Single-dose methotrexate for the treatment of ectopic pregnancy: Northwestern Memorial Hospital three-year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174:1840-6.
- Stock RJ. Gross Pathology and microscopic histopathology. In: Stovall TG, Ling FW (eds). *Extrauterine pregnancy: clinical diagnosis and management.* Nova Iorque: McGraw-Hill; 1993; p. 65-96.
- Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2004; 113:14-8.
- Stovall TG, Ling FW, Gray LA, Carson SA, Buster JE. Methotrexate treatment of unruptured ectopic pregnancy: a report of 100 cases. *Obstet Gynecol.* 1991; 77:749-53.
- Stovall TG, Ling FW. Single-dose methotrexate: an expanded clinical trial. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168:1759-62.
- Tanaka T, Hayashi H, Kutsuzawa T, Fujimoto S, Ichinoe K. Treatment of interstitial ectopic pregnancy with methotrexate: report of a successful case. *Fertil Steril.* 1982; 37:851-5.
- Tay JI, Moore J, Walker JJ. Ectopic pregnancy. *BMJ.* 2000; 320:916-9.
- Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endometrial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril.* 1996; 66:72-80.
- Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 37:21-9.

- Trio D, Lapinski RH, Strobelt N, Ghidini A, Picciolo C. Prognostic factors for successful expectant management of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1995; 63:469-72.
- Tulandi T, Atri M, Bret P, Falcone T, Khalife S. transvaginal intratubal methotrexate treatment of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1992; 58:98-100.
- Tuomivaara L, Kauppila A. Radical or conservative surgery for ectopic pregnancy? A follow-up study of fertility of 323 patients. *Fertil Steril*. 1988; 50:580-3.
- Turner LA, Cyr M, Kinch RA, Liston R, Kramer MS, Fair M, Heaman M; Maternal Mortality and Morbidity Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. Under-reporting of maternal mortality in Canada: a question of definition. *Chronic Dis Can*. 2002; 23:22-30.
- 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*. 2008. No prelo.
- Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Kaji Y, Poulaki V, Moore J, Moore T, Amano S, Horikawa Y, Dartt D, Golding M, Shima DT, Adamis AP. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:368-74.
- Vasquez G, Winston RM, Brosens IA. Tubal mucosa and ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1983; 90:468-74.

- Vauntraub MT, Lima RSBC, Peterson HN, Almeida Júnior WJ, Silva HMS, Caetano JPJ. Tratamento da gravidez tubária íntegra com metotraxate intra-amniótica por controle ultra-sonográfico – relato de um caso. J Bras Ginec. 1993; 103:89-91.
- Vermesh M, Silva PD, Rosen GF, Stein AL, Fossum GT, Sauer MV. Management of unruptured ectopic gestation by linear salpingostomy: a prospective, randomized clinical trial of laparoscopy versus laparotomy. Obstet Gynecol. 1989; 73:400-4.
- Yao M, Tulandi T. Current status of surgical and nonsurgical management of ectopic pregnancy. Fertil Steril. 1997; 67:421-33.
- Zugaib M. Gravidez ectópica. In: Zugaib M (ed). Obstetrícia. Barueri: Manole; 2008; p.549-65.
- Zusterzeel PL, Span PN, Dijksterhuis MG, Thomas CM, Sweep FC, Massuger LF. Serum vascular endothelial growth factor: a prognostic factor in cervical cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2008. No prelo.

Apêndices

Apêndice A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.12.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1118/06**, intitulado: **"Relação entre as concentrações séricas do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a invasão trofoblástica na parede tubária em gestação ectópicas"**, apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Pedro Paulo Pereira

Pesquisador(a) Executante : Fabio Roberto Cabar

CAPPesq, 20 de dezembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Apêndice B

ALGORITMO PARA DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO ECTÓPICA

* Sensibilidade 25 mUI/mL

** Terceiro Padrão Internacional – OMS

Apêndice C

SETOR DE OBSTETRÍCIA DE EMERGÊNCIA
CLÍNICA OBSTÉTRICA – HCFMUSP
Gestação ectópica

Nome: _____ Idade: _____

Cor: _____

Est.civil: _____ Escolaridade: _____ Profissão: _____

End: _____ Cidade: _____ Tel: _____

RGHC: _____ Data: ____/____/____ Alta: ____/____/____

HPMA: _____

Antecedentes: Menarca: ____ anos 1ª relação: ____ anos

Nº de parceiros: _____

DST: sim não Corrimento: sim não

Fumante: sim (nº de 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 de 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 vitelina, anel tubário, imagem complexa, líquido livre ausente, líquido livre restrito ao FSP, líquido livre envolvendo útero até anexos, líquido livre em goteira parieto-cólica ou espaço de Morrison.

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

Tamanho da imagem: ____/____/____ cm

GE: Íntegra Rota

Conduta

Cirurgia dia: ____/____/____ – Laparoscopia – laparotomia

Salpingectomia, salpingostomia, ressecção parcial da tuba

Lado da GE:(direto, esquerdo, ambos)

Local(ampola, ístmico,fímbria,interstício,ovário, colo, abdômen)

expectante, MTX (local, sistêmico), outras:

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

Data								
Hb								
Ht								
Leuco								
Plaq								
Prog								
β-hCG								

Apêndice D

POSTER SESSION

Early pregnancy: basic research

P-427 Poster Vascular endothelial growth factor as a predictor of trophoblastic invasion into the tubal wall in ectopic pregnancy

F.R. Cabar¹, P.P. Pereira¹, R. Schultz², R.P. Francisco¹, M. Zugaib¹¹Faculty of Medicine - University of Sao Paulo, Obstetrics and Gynecology, Sao Paulo, Brazil, ²Faculty of Medicine - University of Sao Paulo, Pathology, Sao Paulo, Brazil

Introduction: Ectopic pregnancy (EP) is considered to be a true public health problem since it is still a major cause of maternal morbidity and mortality. Implantation of trophoblastic tissue into the tubal wall may impair oviductal function either by altering the ciliary epithelium or mainly by causing architectural derangement of the wall musculature due to an inflammatory reaction, increasing the risk for a new episode of EP. It is believed that impairment of tubal function depends on the degree of invasion of the trophoblast into the tubal wall. The secretion and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) is dependent on local conditions, such as hypoxia and it has been observed that the cellular VEGF production is increased in hypoxic conditions. Predictive factors of damage to the fallopian tube may guide the treatment for patients with tubal pregnancy. The aim of the present study was to correlate the depth of trophoblastic penetration into the tubal wall with serum concentration of VEGF and to assess its predictive value.

Methods: prospective study; 30 patients with ampullary pregnancy and gestational age from 42 to 56 days undergoing salpingectomy were analysed. Trophoblastic invasion was histologically classified as stage I when limited to the tubal mucosa, stage II when extending to the muscle layer, stage III in the case of complete tubal wall infiltration. We correlated the depth of trophoblastic infiltration into the tubal wall with VEGF serum concentration on the day of surgery.

Results: Histologic analysis showed that 10 patients (33.3%) had stage I tubal infiltration, 9 (30.0%) had stage II, and 11 (36.7%) had stage III. The gestational age ranged from 42 to 56 days (47.9 ± 4.9), no significant difference in gestational age between the three groups ($P = 0.09$). One-way analysis of variance revealed a significant correlation between the different stages of trophoblastic invasion and VEGF levels ($P < 0.001$). Significantly lower values were observed for patients with stage I infiltration compared to stages II and III ($P < 0.05$). Logistic regression analysis was performed and showed that serum VEGF concentration was predictive of the stage of trophoblastic invasion into the tubal wall ($P < 0.05$). VEGF levels of 305 pg/ml showed 100.0% sensitivity and 85.0% specificity for stage I (ROC curve area 0.93), and levels of 425.9 pg/ml showed 81.8% sensitivity and 94.7% specificity for stage III (ROC curve area 0.88), with an OR = 81.0 (95% CI = 7.7– ∞).

Conclusions: In ampullary pregnancies, maternal serum VEGF is correlated with depth of trophoblastic penetration into the tubal wall and its concentration could predict the depth of penetration.

P-428 Poster Mouse PAI-1 promotes placental by increasing fetal and maternal angiogenesis

S. Labied¹, C. Munaut¹, S. Blacher¹, N. Coqué², O. Sandra², P. Carmeliet³, J.M. Foidart⁴, F. Franken⁵¹University of Liège, Laboratory of Tumor and Development Biology, Sart Tilman (Liège), Belgium, ²INRA, Biologie du Développement et de la Reproduction, Jouy-en-Josas, France, ³KUL, Center of Transgene technology and Gene Therapy, Leuven, Belgium, ⁴University of Liège, Department of Obstetrics and Gynecology-CHR, Liège, Belgium, ⁵University of Liège, Laboratory of Tumor and Development Biology, Liège, Belgium

Introduction: Murine placental invasion is associated with trophoblastic cells invasion of the maternal endometrium and extensive maternal and foetal angiogenesis. Both processes involve protease-dependent extracellular matrix remodeling. Among the protease inhibitors, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1) is transiently produced by spongiotrophoblasts and trophoblast giant cells at days 10.5–11.5 day post-coitum (dpc). Although accumulating evidence demonstrates the key role of PAI-1 in pathological angiogenesis, its function

during placental vascularization remains to be elucidated. PAI-1 knockout mice are fertile and the litter sizes are normal. We have therefore analysed the consequence of PAI-1 deficiency on murine placentation.

Materials and methods: We have studied the possible role of PAI-1 by quantitating the placental vessel density, the relative thickness of the labyrinth, decidua and spongiotrophoblast at day 10.5, 12.5 and 14.5 dpc in mice deficient for PAI-1 or in control mice. An original method of computer-assisted image analysis allowed us to quantify alterations of several placental compartments identified with specific monoclonal antibodies (keratin, desmin, fibrinogen and MECA-32). To investigate the differentially expressed genes, we performed laser capture microdissection (LCM), followed by genome-wide expression profiling using high-density oligonucleotide microarray analysis (GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix). Data were analysed through the use of Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems®, www.ingenuity.com).

Results: At 10.5 and 12.5 dpc, an abnormal placental morphology was observed in both labyrinth and spongiotrophoblast layers in PAI-1^{-/-} mice. Lack of PAI-1 resulted in a transient decreased maternal and fetal vascularization of the placenta that caused (1) an enhancement in the decidua/labyrinth and labyrinth/spongiotrophoblast thickness ratios, (2) a significant increase of trophoblast density. Normalization of placental morphology occurred by day 14.5 dpc in PAI-1 deficient mice. Statistical analysis of microarrays revealed 706 genes differentially expressed between PAI-1 deficient and normal mice in the labyrinth zone at 10.5 dpc. At 14.5 dpc, only 205 genes are differentially expressed. Using Ingenuity Pathways Analysis most of those genes were found to be associated to lipid metabolism, cellular growth and proliferation.

Conclusions: Despite a transient PAI-1 requirement for optimal placental angiogenesis, this gene does not appear to be essential for trophoblast invasion and placentation.

P-429 Poster Expression of the cannabinoid receptor (CB1) in the human fallopian tube: a potential regulator of embryo transport

A.W. Horne¹, N. Kane¹, P. Lourenco¹, A.R.W. Williams², S.K. Dey³, H.O.D. Critchley¹¹The Queen's Medical Research Institute, Reproductive and Developmental Sciences (Centre for Reproductive Biology), Edinburgh Scotland, United Kingdom, ²University of Edinburgh, Pathology, Edinburgh Scotland, United Kingdom, ³Vanderbilt University, Pediatrics Cell & Developmental Biology and Pharmacology, Nashville Tennessee 37232, U.S.A.

Introduction: Understanding the factors regulating embryo transport in the fallopian tube has important clinical implications. Embryo retention in the tube due to fallopian tube dysfunction is thought to lead to tubal ectopic pregnancy, a considerable cause of morbidity and occasional mortality. In mice, genetic or pharmacological silencing of the cannabinoid receptor, CB1, causes retention of a large number of embryos in the oviduct, eventually leading to pregnancy failure. Aberrant cannabinoid signalling impedes co-ordinated oviductal smooth muscle contraction and relaxation crucial to normal oviductal embryo transport. The expression pattern of CB1 was therefore examined in normal human fallopian tube obtained throughout the menstrual cycle, in fallopian tube from women with ectopic pregnancy and in decidualized endometrium from women with tubal ectopic and intra-uterine pregnancies.

Materials and methods: Fallopian tube biopsies ($n = 18$) and sera (for measurement of oestradiol and progesterone for endocrine staging) were collected from women undergoing gynaecological procedures for benign conditions. Uterine decidua was collected from women undergoing surgical management of tubal ectopic pregnancy ($n = 11$); surgical management of miscarriage ($n = 6$); and surgical termination of pregnancy ($n = 8$) and purified by 'saline-separation'. Using a combination of RT-PCR and immunohistochemistry, the mRNA and protein expression pattern of CB1 was examined in these tissues.

Results: In the normal human fallopian tube, CB1 mRNA was higher in the progesterone-dominant mid-luteal phase compared to the follicular phase ($P < 0.05$). CB1 protein showed strong expression in the epithelium of the fallopian tube, sparing the stroma and smooth muscle. In fallopian tube from women with ectopic pregnancies, CB1 mRNA expression was low, mimicking that of the fallopian tube in the follicular phase. CB1 protein expression in fallopian tube from

Apêndice E

22ª JORNADA DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO

Centro de Estudos "Ayres Netto"
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

5 a 7 de junho de 2008 - Centro de Convenções Rebouças - São Paulo - SP

CERTIFICADO

O DOGI – Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e o CEAN – Centro de Estudos "Ayres Netto", outorgam o "Prêmio Sylla Mattos" aos autores: **Fábio Roberto Cabar, Pedro Paulo Pereira, Regina Schultz, Rossana Pulcinelli Francisco e Marcelo Zugaib**, pelo trabalho intitulado "Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF): Diagnóstico de Gestação Ectópica e Predição da Profundidade de Invasão do Tecido Trofoblástico na Parede Tubária".

São Paulo, 7 de junho de 2008.

Tsutomu Aoki
Presidente

Vilmar Marques de Oliveira
Presidente da Comissão Científica

Paulo Augusto Azeiteiro G. Ribeiro
Secretário Geral

Santa Maria Rolim R. Lima
Tesoureiro

Antonio Pedro F. Augé
Presidente da Comissão Executiva

REALIZAÇÃO

Faculdade de Ciências Médicas
da Santa Casa de São Paulo

PATROCÍNIO

SANTA JOANA
IMPLANTAÇÃO E MANUTENÇÃO