

Marcelo Octavio Fernandes da Silva

ASSOCIAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO VÁSCULO-ENDOTELIAL E DE
POLIMORFISMOS DO SEU GENE COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências pelo programa de pós-graduação
em Obstetrícia.

São Paulo

2010

Marcelo Octavio Fernandes da Silva

ASSOCIAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO VÁSCULO-ENDOTELIAL E DE
POLIMORFISMOS DO SEU GENE COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências pelo programa de pós-graduação
em Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Julio Elito Jr.

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Daher

São Paulo

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA

CHEFE DO DEPARTAMENTO:

Prof. Dr. Antonio Fernandes Moron

COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Profa. Dra. Rosiane Mattar

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de figuras.....	xii
Resumo	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	20
3.1 Desenho do estudo.....	21
3.2 Cálculo do tamanho amostral do grupo VEGF e VEGF controle.....	23
3.3 Cálculo do tamanho amostral do grupo polimorfismo e polimorfismo controle...	23
3.4 Aspectos éticos.....	24
3.5 Método.....	24
- Metodologia dos grupos VEGF e VEGF controle.....	25
- Análise estatística dos grupos VEGF e VEGF controle	26
- Metodologia dos grupos polimorfismo e polimorfismo controle.....	26
- Análise estatística dos grupos polimorfismo e polimorfismo controle.....	34
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	51
7 ANEXOS.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ABSTRACT	
APÊNDICE	

Dedicatória

A meus queridos pais, Elza e José Octavio, que me educaram em um ambiente de amor, sabendo me ensinar e demonstrar os valores mais importantes da vida. Sendo para mim exemplos de fé, amor, moral e esforço.

A minha esposa Priscila, pelo apoio incondicional e incentivo durante estes anos de pesquisa.

A meus filhos Gabriel e Henrique, pela compreensão, nos inúmeros períodos de ausência.

A todos os membros da minha família, que sempre me apoiaram e me auxiliaram durante toda minha formação acadêmica, sem nada buscarem em troca.

Agradecimentos

Tenho certeza de que nunca poderei retribuir de forma satisfatória a todas as pessoas que me receberam e auxiliaram nesta instituição.

Agradeço a Deus, que sempre me ofereceu oportunidades em todas as fases da minha vida.

Ao Prof. Dr. Julio Elito Jr, meu orientador, que além de me receber como pós-graduando e de sempre apoiar e incentivar meu trabalho, principalmente nas horas mais difíceis, nunca se mostrou indisponível e, apesar de todos os compromissos, dedicou muitas horas do seu tempo para a conclusão deste estudo. Considero o senhor um exemplo de amizade, moral, profissionalismo e dedicação ao próximo.

À Profa. Dra. Silvia Daher, pelo seu auxílio e supervisão irrestritos no Laboratório de Obstetrícia, pela preocupação constante com o bom andamento da pesquisa e por todo o apoio, compreensão, disponibilidade e afeto que me ofereceu durante esta fase tão importante da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes Moron, Professor Titular do Departamento de Obstetrícia, pela seriedade e dedicação com que conduz o Departamento.

À Profa. Dra. Rosiane Mattar, Professora Livre-Docente e Coordenadora da Pós-graduação do Departamento de Obstetrícia, por ter me recebido e aceitado nesta instituição, dando-me a oportunidade de vencer mais uma etapa tão importante da minha vida.

Aos membros da Comissão Julgadora para Qualificação do Projeto de Mestrado, Prof. Dr. Luiz Camano, Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, Profa. Dra. Rosiane Mattar, Profa. Dra. Sue Yazaki Sun, pelas suas considerações que muito contribuíram para o aprofundamento do meu conhecimento e para melhorar a qualidade desta tese.

Aos professores doutores do Departamento de Obstetrícia, pela participação no meu aprimoramento profissional.

Aos professores doutores e funcionários dos Ambulatórios de Reprodução Humana e de Climáterio da UNIFESP, representados aqui pelo Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho, Prof. Dr. Mauro Abi Haidar e Dr. Renato Fraietta, pelo auxílio na procura de pacientes para os grupos controles, abrindo as portas dos citados ambulatórios.

A todos os funcionários, alunos e pós-graduandos com quem tive contato nos Laboratórios da UNIFESP, especialmente a Karen Priscilla Tezotto Pendeloski, Camila Sommerauer Franchim e Natali Maiumi Higashi Marcení, pelos vários momentos em que recebi auxílio e orientações durante os processos laboratoriais, tão diferentes dos procedimentos do dia-a-dia de um obstetra.

A todos os funcionários do Departamento de Obstetrícia, que sempre se mostraram solícitos e diligentes para a solução das dificuldades administrativas.

A todas as pacientes que aceitaram participar da pesquisa, pela contribuição à meu crescimento pessoal e profissional e à expansão do conhecimento médico e científico.

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento desta pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenina

β -hCG: hormônio gonadotrófico coriônico

bp: pares de bases

C: citosina

CCN: comprimento cabeça-nádega

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide (brometo de cetiltrimetilamônio)

DIU: dispositivo intra-uterino

DIP: doença inflamatória pélvica

DNA: ácido desoxirribonucleico

DST: doenças sexualmente transmissíveis

DTAB: dodecyltrimethylammonium bromide (brometo de dodeciltrimetilamônio)

ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay

FIV: fertilização *in vitro*

Flt-1: receptor 1 de VEGF (VEGF R1)

Flk-1: receptor 2 de VEGF (VEGF R2) ou KDR

G: guanina

GB: gravidez bioquímica

GE: gravidez ectópica

GIUi: gravidez intra-uterina inviável

GIUv: gravidez intra-uterina viável

HLP: lactogênio placentário humano

IG: idade gestacional

IL: interleucina

LIF: fator de inibição de leucemia

NaCl: cloreto de sódio

PAPP-A: proteína plasmática associada à gestação A

PCR: reação de cadeia de polimerase

PLGF: fator de crescimento placentário

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

RFLP: polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição

SNP: single nucleotide polymorphism

SP-1: proteína sérica específica 1

T: timina

TNF- α : fator de necrose tumoral α

US: ultrassonografia

USTV: ultrassonografia transvaginal

VEGF: fator de crescimento v sculo-endotelial

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

VNTR: número variável de repetições em tandem

LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Marcadores de crescimento inadequado do embrião e trofoblasto.....	6
Quadro 2: Marcadores de insuficiência do corpo lúteo.....	7
Quadro 3: Marcadores de inflamação e irritação peritoneal.....	8
Quadro 4: Marcadores uterinos de implantação normal.....	9
Quadro 5: Marcadores de desenvolvimento gestacional na tuba uterina.....	10
Quadro 6: cálculo do tamanho amostral do grupo VEGF e VEGF controle com percentual de exposição no grupo controle de 10%.....	23
Quadro 7: cálculo do tamanho amostral do grupo polimorfismo e plomorfismo controle com percentual de exposição no grupo controle de 10%.....	24
Quadro 8: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF -460 T/C.....	28
Quadro 9: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF -634 C/G.....	30
Quadro 10: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T	32

Tabela I. Valores séricos do VEGF na gravidez ectópica, abortamento e gestação intrauterina normal. Valores apresentados pela mediana.....	36
Tabela II. . Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634G/C em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.....	37
Tabela III. Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.....	38
Tabela IV. Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo +936C/T em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.....	39
Tabela V. Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.....	39
Tabela VI. Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634 C/G em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.....	40
Tabela VII. Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo +936C/T em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: protocolo de diagnóstico não invasivo de gravidez ectópica do Departamento de Obstetrícia da UNIFESP.....	22
Figura 2: exemplo de polimorfismo do gene do VEGF -460 T/C em gel de agarose..	29
Figura 3: exemplo de polimorfismo do gene do VEGF -634 C/G em gel de agarose..	31
Figura 4: exemplo de polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T em gel de agarose...	33
Gráfico 1- Concentração de VEGF sérico nos casos de abortamento, gestação intrauterina viável e gravidez Ectópica.....	36

RESUMO

Objetivo: Análise do fator de crescimento vsculo-endotelial (VEGF) como marcador sorológico no diagnóstico da gravidez ectópica. Outrossim,  desiderato deste projeto avaliar se as variantes polimórficas -460 T/C (rs833061), -634 C/G (rs2010963) e +936 C/T (rs3025039) do gene do VEGF podem estar associadas à ocorrência da gravidez ectópica (GE). Além disso, procuramos avaliar se os níveis séricos de VEGF estavam correlacionados com o genótipo.

Método: estudo caso-controle, onde foram selecionadas 35 pacientes com diagnóstico de gravidez ectópica, 15 abortamentos e 22 gestações intra-uterinas normais. Foram coletados 10 mL de sangue em tubo seco, centrifugados a 2000 rpm e o sobrenadante foi separado em cinco alíquotas de 200 μ L e armazenados a -80 ° C, para posterior avaliao. A dosagem sérica do VEGF foi realizada por método de ELISA - (human VEGF; R&D systems, Minneapolis). Para a avaliao dos polimorfismos do gene do VEGF foram incluídas 74 pacientes com história prévia ou em vigência de GE, em acompanhamento no Ambulatório de GE da UNIFESP. O grupo controle foi constituído de 134 mulheres na menopausa, com pelo menos duas gestações normais, sem abortos ou GE durante a menacme, em seguimento no Ambulatório de Climatério da UNIFESP. Foram coletados 10 mL de sangue periférico, retirado buffy-coat, do qual é extraído DNA genmico pela técnica de DTAB / CTAB. A genotipagem foi realizada digerindo os produtos de PCR com as enzimas de restrio específicas para os polimorfismos do gene de VEGF +936 C/T, -634 C/G e -460 C/T. Os dados foram analisados pelo teste χ^2 ou teste exato de Fisher, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

Resultados: Nos casos estudados a média dos valores séricos do VEGF foi de 297,5 pg/mL na gravidez ectópica, 299,6 pg/mL no abortamento e de 39,9 pg/mL nas gestações intra-uterinas normais ($p < 0,0001$). Não foram identificadas diferenças significantes quanto as frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos do gene do VEGF +936 C/T ($p = 0,28$), -460 C/T ($p = 0,70$) e -634 G/C ($p = 0,17$). Não foi identificada relao entre os valores séricos de VEGF e os genótipos para nenhum dos polimorfismos de VEGF testados.

Conclusão: Nossos resultados sugerem que na gravidez ectópica sejam detectados valores séricos mais elevados de VEGF do que na gravidez intra-uterina

viável. Por outro lado, quando comparamos os valores de VEGF na gravidez ectópica com os casos de abortamento, não encontramos diferença estatisticamente significativa. Não foi identificada associação entre a expressão de polimorfismo +936 C/T, -634 C/G e -460 C/T do gene do VEGF e nem de seus alelos com a ocorrência de gravidez ectópica. Não foi identificada relação entre os níveis séricos de VEGF e os genótipos para nenhum dos polimorfismos de VEGF testados. A produção de VEGF sérico parece não ter correlação com o genótipo.

Entende-se como gravidez ectópica (GE), a implantação e o desenvolvimento do ovo fora da grande cavidade uterina. A localização mais frequente é a tubária, observando-se aumento de sua incidência nos últimos anos (CDC, 1995).

A gravidez ectópica é considerada doença de grande importância, por vários motivos, entre eles citamos o grande número de manifestações, por vezes de prognóstico ominoso, como hemorragias copiosas, necessidade de transfusões sanguíneas, aderências pélvicas e comprometimento do futuro reprodutivo. Atualmente há perspectiva de realizar o diagnóstico precoce o que propicia o emprego de condutas conservadoras, evitando, assim, cirurgias de emergência por abdome agudo e possibilitando, em casos selecionados, até mesmo o tratamento clínico (Elito Júnior et al., 2005 a; Elito Júnior et al., 2005 b; Elito Júnior et al., 2006; da Costa Soares et al., 2008).

Conduta menos radical é muito importante em alguns casos, sobretudo em pacientes com desejo reprodutivo e que, muitas vezes, não têm acesso a métodos de fertilização *in vitro*. Outrossim, a paciente com história de gestação ectópica prévia tem risco 6 a 8 vezes maior de recidiva (Ankum et al., 1996).

Estima-se que nos últimos 20 anos, o número de casos de GE atingiu a proporção de aproximadamente duas em cada cem gestações normais, em países industrializados. Epidemiologicamente, a frequência cresceu seis vezes no período de 1970 a 1992, passando de 17.800 ocorrências em 1970 para 108.800 em 1992, o crescimento se deve ao aumento dos casos de doença sexualmente transmissíveis (DST), tabagismo, cirurgia tubária, infertilidade e idade materna avançada entre as mulheres em idade fértil (CDC, 1995; Gerton et al., 2004). Alguns trabalhos mostraram resultados diferentes em certos países, caso do Reino Unido onde a incidência de GE pouco se alterou na última década, indo de 9,6/1000 em 1991 a 1993 para 11,1/1000 em 1997 a 1999 (RCOG, 2001). Nos Estados Unidos, segundo Zane et al. em 2002, houve declínio do número de casos novos por ano de 58.178 para 35.382, entre 1992 e 1999.

Em contrapartida, a mortalidade decorrente da GE nos EUA decresceu satisfatoriamente, tendo sido registrados 35,5 óbitos para 10.000 casos em 1970; e 3,8 em 10.000 no ano de 1989 (Goldner et al., 1993). Apesar disso a GE continua sendo a principal causa de mortalidade materna no primeiro trimestre da gravidez, contribuindo

com 80% dos óbitos neste período (Sowter, Farquhar, 2004). É responsável por 9 a 13% de mortes maternas durante todo o período gestacional (Nederlof et al., 1990; Gerton et al., 2004; Mueller et al., 2004)

A etiologia da gravidez ectópica é ainda desconhecida. Não existe nenhum modelo animal para esta doença. Apesar de muitos fatores de risco terem sido associados com o diagnóstico da gravidez ectópica, não se sabe ainda ao certo se estão relacionados à etiologia. As teorias etiopatológicas para gravidez ectópica geralmente distinguem fatores de risco maternos e embrionários. Os maternos (gravidez ectópica prévia, infecção, cirurgia tubária, usuárias de DIU, tabagismo, infertilidade, endometriose, e fatores hormonais como pílula de progesterona e anticoncepção de emergência) afetam a função da tuba de Falópio e o transporte do embrião para o útero. Os embrionários incluem anomalias estruturais e cromossômicas do conceito. É importante ressaltar que muitas pacientes com gravidez ectópica não apresentam nenhum fator de risco e o exame macroscópico da pelve é completamente normal. Por isso a investigação de rastreadores sorológicos e fatores predisponentes ainda é aspecto a ser explorado.

1.1 Diagnóstico

Mesmo com os avanços da tecnologia ecográfica com aparelhos de ultrassonografia transvaginal (USTV) de última geração e do aumento da sensibilidade dos testes laboratoriais de gravidez como a fração beta do hormônio gonadotrófico coriônico (β -hCG), a GE incipiente pode passar despercebida em 40-50% das vezes (Ankun et al., 1993; Gerton et al., 2004)

Para evitarmos que a paciente evolua para um quadro grave de abdome agudo hemorrágico devido à ruptura tubária, a atenção do obstetra deverá estar voltada para a realização do diagnóstico precoce, ou seja, de gravidez tubária íntegra, possibilitando tanto o tratamento cirúrgico como o clínico (Ichinoe et al., 1987; Elito Júnior et al., 1998; Elito Júnior et al., 1999; Felemban et al., 2002; da Costa Soares et al., 2004; Elito Júnior et al., 2006). Nestas situações a história clínica e o exame físico são pobres e pouco elucidativos, podendo, às vezes, cursar com a tríade clássica de atraso menstrual, dor abdominal e sangramento genital. Esta síndrome pode estar presente também na gravidez incipiente, no abortamento e até na mola hidatiforme. Nestas

INTRODUÇÃO

circunstâncias, devemos lançar mão de exames subsidiários como a dosagem da fração beta do hormônio gonadotrópico coriônico (β -hCG) e a ultra-sonografia transvaginal para o esclarecimento diagnóstico.

A detecção da β -hCG constitui o principal exame para se avaliar a atividade trofoblástica, seus títulos tendem a ser menores na gravidez ectópica quando comparados às tópicas da mesma idade gestacional. O conhecimento do tempo de duplicação deste hormônio é útil na diferenciação entre a gravidez intra-uterina e a ectópica. Na gestação normal ocorre a duplicação da β -hCG entre 1,4 – 2,1 dias, no período entre o 5º e o 25º dia após a concepção. Queremos acentuar que se no intervalo de 48 horas os títulos da β -hCG não mostrarem aumento de pelo menos 53%, é sinal que a gravidez é inviável, ectópica (Barnhart et al., 2004) ou tópica de mau prognóstico que resultará em abortamento em 85% dos casos (Kadar et al., 1981).

O emprego da ultrassonografia no diagnóstico da GE deve ser realizado de preferência pela via transvaginal. O exame consiste em primeiro analisar a cavidade uterina, com o intuito de descartar gravidez tópica pela visualização do saco gestacional ou restos ovulares. Posteriormente devem ser avaliados os ovários, procurando identificar, sempre quando possível, o corpo lúteo. Por fim, o exame consiste em analisar a presença de massa anexial extraovariana, que deve ser caracterizada conforme o seu aspecto (hematossalpinge, anel tubário e embrião vivo) e o achado de líquido livre na cavidade peritoneal é frequente. A ultrassonografia transvaginal, em geral, consegue visualizar a gravidez tópica a partir de 5 a 6 semanas de amenorréia (Fritz, Guo, 1987; Timor-Tritsch et al., 1989).

Quando o diagnóstico for realizado apenas pela ultra-sonografia, mesmo utilizando aparelhos de última geração ainda existe a possibilidade de erro. Entretanto, sua análise em associação com a dosagem da β -hCG, auxilia no esclarecimento diagnóstico. Excepcionalmente, em casos onde ainda não se chegou a um diagnóstico preciso, a curetagem uterina pode ajudar a diferenciar entre abortamento e gravidez ectópica, com achados, respectivamente, de restos ovulares ou reação de Arias-Stella (Stovall et al., 1990; Barnhart et al., 1994; Gracia, Barnhart, 2001).

Existem três possibilidades clínicas em relação à análise dos níveis séricos da β -hCG e US (Cacciatore et al., 1990):

INTRODUÇÃO

- 1º – o diagnóstico de gravidez viável é quase certo quando os níveis da β -hCG forem maiores que 2000 mUI/mL, nesta situação o saco gestacional intra-uterino deve ser visibilizado com a US transvaginal;
- 2º – o diagnóstico de GE é muito provável quando o útero não apresentar saco gestacional intracavitário, à luz da US transvaginal e o nível sérico da β -hCG for maior que 2000 mUI/mL (Nyberg et al., 1988; Cacciatore et al., 1990; Shifren et al., 1996; Clark et al., 1996; Barnhart et al., 2004), exceto nos casos de gestação múltipla;(Chung et al., 2006)
- 3º –nenhum diagnóstico definitivo pode ser feito na condição em que o nível sérico da β -hCG é menor que 2000 mUI/mL, e o útero aparece vazio na US transvaginal. Em tais casos, aguardam-se os próximos dias, quando se podem diagnosticar três possibilidades: abortamento, gravidez normal ou gravidez ectópica. Isto ocorre porque a determinação da β -hCG diagnostica gravidez após oito a dez dias da fertilização, e a ultrassonografia transvaginal só no 21º dia após a concepção, quando evidencia o saco gestacional (Daus et al., 1989). Este período deve ser acompanhado com dosagens seriadas da β -hCG e exames de US.

Baseados na associação da β -hCG e da ultra-sonografia transvaginal, diversos protocolos foram elaborados para o diagnóstico algorítmico da gravidez ectópica. Por outro lado, a dosagem isolada deste hormônio não pode confirmar ou excluir a gravidez ectópica, mas sim auxiliar no diagnóstico através do acompanhamento com dosagens seriadas. Infelizmente, este tipo de monitoramento deixa de ser método prático de diagnóstico numa entidade emergencial como a GE. Nos casos inconclusivos sugere-se a realização destes exames sorológicos a cada 48 horas até a confirmação, somente a partir daí poderá ser instituída a conduta. Muitas vezes nesta etapa de esclarecimento diagnóstico ocorre a ruptura tubária tornando necessária cirurgia em caráter de emergência e com risco de morte. Com o intuito de abreviar o diagnóstico, vários autores têm proposto a avaliação de outros rastreadores sorológicos para GE. Com este objetivo já foram testados vários marcadores, entre eles: marcadores de crescimento inadequado do embrião e trofoblasto (quadro 1), marcadores de insuficiência do corpo lúteo (quadro 2), marcadores de inflamação e irritação peritoneal (quadro 3), marcadores uterinos de implantação normal (quadro 4), marcadores de desenvolvimento gestacional na tuba uterina (quadro 5) (Cartwright et al., 2009).

Quadro 1: Marcadores de crescimento inadequado do embrião e trofoblasto:

Marcador	Descrição	Utilidade	Referências
Fração beta da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG)	Hormônio produzido pelo trofoblasto que mantém o corpo lúteo	Dosagens seriadas utilizadas na prática clínica	Seppala, Purhonen (1987), Riss et al. (1989), Garcia et al. (1990), Guillaume et al. (1990), Witt et al. (1990), Mantzavinos et al. (1991), Grosskinsky et al. (1993), Kuscu et al. (1993), Cacciatore et al. (1994), Daily et al. (1994), Korhonen et al. (1996), O'Leary et al. (1996), Mol et al. (1997), Marill et al. (1999), Condous et al. (2004), Mueller et al. (2004) e Seeber et al. (2006)
Proteína plasmática associada à gestação A (PAPP-A)	Protease produzida pelo trofoblasto placentário	Não útil como marcador isoladamente	Seppala, Purhonen (1987), Sjoberg (1987), Mueller et al. (2004) e Daponte et al. (2005)
Glicoproteína β -1 específica da gravidez (SP-1)	glicoproteína produzida pelo trofoblasto placentário	Diminuída na gravidez ectópica. Potencial marcador. Necessários mais estudos	Ho, Jones (1980), Seppala, Purhonen (1987), Tornehave et al. (1987), Witt et al. (1990), Mantzavinos et al. (1991) e Mueller et al. (2004)
Lactogênio placentário humano (HLP)	Hormônio placentário que aumenta	Não útil como marcador isoladamente	Kuscu et al. (1993), Mueller et al. (2004) e Daponte et al. (2005)
Activina A	Glicoproteína produzida pela decídua e ovário	Diminuída na gravidez ectópica. Necessários mais estudos	Florio et al. (2007) e Kirk et al. (2008)

Quadro 2: Marcadores de insuficiência do corpo lúteo:

Marcador	Descrição	Utilidade	Referências
Progesterona	Hormônio esteróide sexual produzido pelo corpo lúteo e pela placenta que mantém o endométrio durante a gravidez	Não útil como marcador isoladamente	Matthews et al. (1986), Yeko et al. (1987), Buck et al. (1988), Riss et al. (1989), Guillaume et al. (1990), Witt et al. (1990), Gelder et al. (1991), Mantzavinos et al. (1991), Stovall et al. (1992), Grosskinsky et al. (1993), Kuscu et al. (1993), Daily et al. (1994), McCord et al. (1996), O'Leary et al. (1996), Mol et al. (1998b), Buckley et al. (2000), Condous et al. (2004), Mueller et al. (2004), Daponte et al. (2005) e Katsikis et al. (2006)
Estradiol	Hormônio esteróide sexual produzido pelo ovário e corpo lúteo em resposta ao hCG	Diminuído na gravidez ectópica. Valores discriminatórios muito próximos	Guillaume et al. (1990), Witt et al. (1990), Mantzavinos et al. (1991), Grosskinsky et al. (1993) e Kuscu et al. 1993)
Relaxina	Hormônio peptídico produzido pelo corpo lúteo	Diminuída na gravidez ectópica. Potencial marcador. Necessários mais estudos	Garcia et al. (1990) e Witt et al. (1990)
Renina	Enzima envolvida na regulação do volume sanguíneo	Diminuída na gravidez ectópica. Potencial marcador. Necessários mais estudos	Meunier et al. (1991)
Inibina A	Maior produto peptídico do corpo lúteo. Também produzido pelo trofoblasto	Diminuída na gravidez ectópica. Potencial marcador. Necessários mais estudos	Illingworth et al. (1996), Seifer et al. (1996), D'Antona et al. (1998) e Segal et al. (2008)

Quadro 3: Marcadores de inflamação e irritação peritoneal:

Marcador	Descrição	Utilidade	Referências
Antígeno carcinogênico (Ca-125)	Antígeno de superfície celular primariamente marcador tumoral de linhagens do trato genital feminino e decídua	Elevado em abortamentos. Não útil para diferenciar GE de gestação intra-uterina viável	Halila et al. (1986), Brumsted et al. (1990), Witt et al. (1990), Sadovsky et al. (1991), Kuscu et al. (1993) e Katsikis et al. (2006)
Receptores de interleucina-2	Proteína expressa na superfície de linfócitos T	Não útil como marcador preditivo isoladamente	Soriano et al. (2003)
Interleucina -6	Citocina pró-inflamatória secretada por linfócitos-T	Aumentada na gravidez ectópica se comparada à viável e à não viável. Marcador potencialmente útil. Necessários mais estudos	Soriano et al. (2003)
Interleucina 8	Citocina produzida por macrófagos	Necessários mais estudos	Soriano et al. (2003)
Fator de necrose tumoral (TNF)	Citocina envolvida na regulação da resposta imune	Necessários mais estudos	Soriano et al. (2003)

Quadro 4: Marcadores uterinos de implantação normal:

Marcador	Descrição	Utilidade	Referências
Fator de inibição de leucemia (LIF)	Citocina glicopeptídica	Não útil como marcador preditivo isoladamente.	Wegner & Mershon (2001) e Daponte et al. (2005)
Glicodelina	Maior produto de secreção endometrial	Resultados de estudos anteriores não repetidos em estudos maiores e mais recentes. Não útil como marcador isoladamente.	Pedersen et al. (1991), Ruge et al. (1992), Stabile et al. (1994), Foth & Romer (2003) e Daponte et al. (2005)
Activina B	Glicoproteína que é produzida pela decídua e aumenta a secreção de FSH	Diminuída na GE. Marcador em potencial. Necessita de mais estudos.	Horne et al. (2008)

Quadro 5: Marcadores de desenvolvimento gestacional na tuba uterina:

Marcador	Descrição	Utilidade	Referências
Creatino-quinase	Enzima liberada por danos a células musculares	Dados conflitantes quanto ao valor de corte. Aumentada na rotura tubária. Possível marcador para gravidez ectópica rota.	Lavie et al. (1993), Chandra & Jain (1995), Duncan et al. (1995), Paige & Kurzel (1995), Darai et al. (1996), Garcia-Velasco et al. (1996), Korhonen et al. (1996), Lincoln et al. (1996), Qasim et al. (1996), Vandermolen & Borzelleca (1996), Plewa et al. (1998), Birkhahn et al. (2000a, 2001), Kurzel et al. (2001), Develioglu et al. (2002) e Soundravally et al. (2007)
Mioglobina	Proteína componente das fibras musculares	Não útil como marcador isoladamente	Birkhahn et al. (2001)
Miosina de cadeia pesada do músculo liso	Proteína componente das fibras musculares	Não útil como marcador isoladamente	Birkhahn et al. (2000b, 2001)
Fator de crescimento vâsculo-endotelial (VEGF)	Potente fator angiogênico que atua na angiogênese no sítio de implantação	Possivelmente útil como marcador preditivo isolado para gravidez ectópica em grupos selecionados	Daniel et al. (1999), Felemban et al. (2002), Kucera-Sliutz et al. (2002), Fasouliotis et al. (2004), Mueller et al. (2004) e Daponte et al. (2005)

Dentre estes marcadores bioquímicos, um dos mais estudados é o VEGF. Desta forma iremos nos ater mais especificamente a este marcador.

1.2. Fator de crescimento vâsculo-endotelial

Rastreador sorológico eficiente, capaz de diferenciar a gravidez tópica da ectópica, ainda não está disponível. A implantação e placentação são passos iniciais fundamentais para o estabelecimento da gravidez viável. Estas duas etapas iniciais dependem de profundo processo de angiogênese (Reynolds et al., 1992), cujo principal responsável é o fator de crescimento vâsculo-endotelial.

O fator de crescimento v sculo-endotelial (VEGF)   glicoproteína que se liga   heparina, produzida por vários tecidos, incluindo ovário, tuba (Kucera-Sliutz et al., 2002; Fasouliotis et al., 2004), e trofoblasto (Daniel et al., 1999; Mueller et al., 2004), é fator angiog nico potente (Leung et al., 1989; Neufeld et al., 1999), envolvido em diversas fases da reprodução fisiológica (Torry, Torry, 1997). Funciona como modulador do crescimento, remodelação e permeabilidade vascular no endométrio, decídua e trofoblasto (Clark et al., 1996; Torry, Torry, 1997; Kucera-Sliutz et al., 2002). O VEGF também é fundamental no desenvolvimento vascular do embrião (Carmeliet et al., 1996).

A expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do VEGF é rapidamente induzida por hipóxia tanto *in vitro* como *in vivo*. Sua expressão   também aumentada em estados fisiológicos e patológicos em que se observa aumento da angiog nese, por exemplo, na cavidade uterina e ovários durante o ciclo menstrual e na placenta na gravidez incipiente. O RNAm do VEGF foi demonstrado no cito e sinciciotrofoblasto, em células perivasculares, e também no âmnio (Torry, Torry, 1997).

A produção e secreção do VEGF dependem de condições locais como a hipóxia (Ladoux, Frelin, 1993), podendo também ser induzido por fatores de crescimento e citocinas. O ambiente de implantação da tuba é muito diferente do endométrio que é muito mais vascularizado, e isto pode afetar a síntese e liberação do VEGF.

Possivelmente, a implantação do conceito na tuba pode estimular a produção de VEGF na tentativa de acomodar a gravidez neste ambiente desfavorável. Desta forma, foi sugerido que a alteração dos níveis do VEGF na fase inicial da gravidez represente rastreador sorológico da gravidez ectópica incipiente (Daniel et al., 1999).

Daniel et al., (1999) realizaram estudo prospectivo com o intuito de determinar se o VEGF poderia servir como parâmetro no diagnóstico de gravidez ectópica. Avaliaram os níveis séricos de VEGF em 40 pacientes, sendo que 20 com diagnóstico de gravidez ectópica, 10 casos de gravidez normal e 10 de abortamentos. Os valores de VEGF sérico foram em média de 226,8 pg/mL (19,4 a 561,7 pg/mL) nos casos de GE, de 24,4 pg/mL nos casos de gestação intra-uterina viável (GIUv) e 59,4 pg/mL nos de gestação intra-uterina inviável (GIUi). Os resultados obtidos sugerem que o VEGF represente uma ferramenta para o diagnóstico da GE com sensibilidade de 60%, especificidade de 90% e valor preditivo positivo de 86%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Felemban et al., (2002), que avaliaram 45 mulheres com gestação normal, inviável e ectópica. Valores elevados de VEGF puderam diferenciar a gravidez intra-uterina normal da ectópica com sensibilidade de 88%, especificidade de 100% e valor preditivo positivo de 100%. Entre GE e gravidez intra-uterina inviável, a sensibilidade foi de 87,5%, especificidade de 75% e valor preditivo positivo de 77,8%. Os valores de VEGF encontrados foram de $27,0 \pm 4,4$ pg/ml (gestação normal), $169,7 \pm 16,6$ pg/ml (gestação intra-uterina inviável) e $306,1 \pm 26,5$ pg/ml (gravidez ectópica). Os autores afirmaram que o VEGF é um marcador em potencial para GE.

Kucera-Sliutz et al., (2002) estudando 84 mulheres com diagnóstico de GE ou GIUi (42 casos em cada grupo), não encontraram diferença significativa. Neste estudo as pacientes apresentavam a idade gestacional (IG) mais avançada (± 6 semanas) em comparação com os outros estudos, e isto pode ter contribuído para a divergência nos resultados.

Mueller et al., (2004) avaliaram o VEGF e outros marcadores sorológicos com o intuito de diagnosticar a gravidez ectópica. Os valores séricos do VEGF estavam muito aumentados na gravidez ectópica. O VEGF demonstrou correlação positiva para o diagnóstico de GE. Entre os casos de GE confirmados por laparoscopia (43casos) o VEGF variou de 11,1 a 1056 pg/mL, sendo que, dentro do grupo controle, constituído de mulheres com GIUn e IG média de 8,1 semanas, muitos soros (44/79) ficaram próximos do limite de sensibilidade do kit (5 pg/ml) e mostraram valores em queda com o passar da gestação. Observaram que o VEGF em conjunto com a proteína plasmática associada à gestação – A e a progesterona mostraram-se muito eficazes para fazer o diagnóstico diferencial entre gestação tópica e ectópica, resultando em uma sensibilidade de 97,7% e uma especificidade de 92,4%.

Gerton et al., (2004), dosaram o VEGF em sangue periférico de 62 gestantes com GIUn e 77 com GE não encontraram resultados estatisticamente significantes para diferenciar os casos dos controles, relatam que a idade gestacional das pacientes variou entre 2 e 18 semanas.

Fasouliotis et al., (2004) avaliaram a concentração sérica de VEGF após a FIV e observaram que elevados valores após 11 dias da transferência dos embriões estavam associados a GE. Neste estudo foram incluídas 27 pacientes com GE, 27 com GIUn,

27 com gestação bioquímica e 27 GIUi e foi observado que, apesar de os níveis séricos de VEGF terem sido consideravelmente mais altos na GE, não houve diferença estatística significativa, mostrando apenas uma tendência. Contudo, se comparada ao total de GIUn e GIUi após excluídos os casos de GB, os níveis de VEGF foram significativamente mais altos, $604,4 \pm 73,4$ pg/ml e $455,4 \pm 27,7$ pg/ml. Utilizando um valor de corte de 700 pg/ml tem-se um valor preditivo positivo de 64% e negativo de 71%.

Daponte et al., 2005, estudando 48 pacientes (27 com GE e 21 com GIUi) cuja IG variou entre 5,5 e 10 semanas (47% entre 6 e 9 semanas), encontraram valor médio de 227,2 pg/mL (34 a 436) de VEGF em vigência de GE, enquanto para GIUi este valor foi de 107,2 pg/mL (0,84 a 169,6). O valor de corte encontrado foi de 174,5 pg/mL com sensibilidade de 0,78 e especificidade de 1,0. Comparando com resultados do grupo de GIUn o valor médio foi de 2,3 (0,55 a 44), corte 31, sensibilidade de 1,0 e especificidade de 0,96. Tendo concluído que o VEGF pode ser marcador útil para diferenciar GE de GIUi.

Ugurlu et al., 2009, estudando 29 pacientes com GE, 29 com abortamentos espontâneos e 28 pacientes apresentando GIU viáveis, obtiveram medianas de VEGF sérico de 55,24 pg/mL, 26,24 pg/mL e 43,24 pg/mL, respectivamente, dados que não foram considerados estatisticamente significantes pelos autores.

Estes estudos demonstram o papel importante do VEGF como rastreador sorológico para o diagnóstico da gravidez ectópica. Como a maioria dos casos não apresenta etiologia clara, podemos aventar a possibilidade de estas pacientes apresentarem uma alteração genética. Ficamos, desta forma, motivados a estudar o polimorfismo do gene do VEGF, uma vez que este marcador apresenta uma correlação muito forte com o desenvolvimento da gestação na tuba de Falópio.

1.3 Polimorfismo

O polimorfismo é variação genética que pode estar associada a diferentes doenças. Para o seu entendimento é importante conhecer alguns fundamentos genéticos. O DNA é responsável por armazenar as informações para a síntese de proteínas pelas células. Ele é formado por diversos nucleotídeos, constituídos por quatro bases nitrogenadas: Citosina (C), Timina (T), Adenina (A) e Guanina (G).

Dentre os nucleotídeos existentes, somente cerca de 2 a 3% de todo o nosso DNA é expresso, porém, modificações, mesmo que aparentemente tênues, destes genes podem resultar em variações e até mesmo doenças de origem genética.

Para entender o que são polimorfismos, é necessário, antes, compreender o que são mutações.

Mutações são, basicamente, alterações na sequência de bases do DNA, que ocorrem com o passar das gerações. Essas mudanças podem ter expressão fenotípica, isto, por sua vez, pode levar à não produção de proteína, à produção de níveis alterados de proteína ou à produção de proteína com função alterada. Algumas mutações monogênicas sabidamente causam doenças, como é o caso da anemia falciforme, doença causada pela substituição de uma única base na sequência de um gene, levando à produção de uma molécula de hemoglobina com estrutura diferente da normal.

Existem vários tipos de mutação, desde as mais grosseiras (deleções, rearranjos e inserções), até mutações de ponto (que alteram usualmente um só par de bases).

Polimorfismo é resultado de mutações ocorridas por milhares de gerações, ocasionando alterações no DNA cuja prevalência mínima na população é igual ou superior a 1%. São muito comuns em nosso DNA, ocorrendo milhares de vezes em todo o genoma. Porém, na maior parte das vezes, não têm influência nenhuma no fenótipo, pois codificam proteínas idênticas ou nem são expressos.

Existem vários tipos de polimorfismos entre eles podemos destacar:

- SNP: single nucleotide polymorphism ou polimorfismo de um único nucleotídeo, quando há substituição de uma única base na sequência de DNA.
- VNTR: variable number of tandem repeats ou número variável de repetições em tandem (em sequência), quando uma certa sequência de bases se repete por um determinado número de vezes no DNA e esse número de repetições costuma ser muito diferente entre os indivíduos.

Durante o processo usado para estudo do DNA, sua cadeia é fracionada após a identificação de *loci* específicos chamados de sítios de restrição, usando uma determinada enzima (enzima de restrição). A alteração de um único par de bases na

INTRODUÇÃO

sequência de DNA pode abolir ou criar um sítio de restrição, gerando um polimorfismo, o qual pode ocorrer em um ou ambos os alelos (hetero ou homozigoto para aquele polimorfismo).

O outro tipo de polimorfismo importante se dá quando acontecem várias repetições de pequenas sequências de bases em tandem (seguidas). O que varia é o número de repetições destas sequências, naquela região do DNA, naquele indivíduo. Tais variações costumam ocorrer em regiões hipervariáveis do genoma, são chamadas de VNTR e são muito relevantes, por exemplo, na medicina forense e em testes de paternidade (Farah, 1997).

De forma resumida, polimorfismo pode ser considerado como sendo alteração na sequência de bases do DNA resultando na apresentação de dois ou mais genótipos alternativos, quando a frequência de cada um deles é superior àquela que poderia ser mantida somente por mutações recorrentes em uma população. Na prática, um *locus* é considerado polimórfico, quando a frequência do genótipo mais raro é de no mínimo 1%.

Recentes avanços em técnicas moleculares têm resultado na descrição de número significativo de polimorfismos genéticos, tanto em SNPs como em microssatelites. As consequências funcionais da maioria desses polimorfismos ainda estão por serem determinadas. Entretanto, eles podem potencialmente resultar em mudança na expressão, sinalização, produção, ligação; portanto, em atividades moleculares alteradas (Akalin, Murphy, 2001).

Investigações para identificar marcadores genéticos de suscetibilidade a patologias também têm sido desenvolvidas. Nesse sentido, tem-se procurado avaliar a associação entre determinado polimorfismo do gene e eventual manifestação patológica, comparando-se os genótipos com as características clínicas da doença (Daher et al., 2003).

O gene codificado do VEGF está localizado no cromossomo 6 na banda p21.3 e compreende região do código de 14-kb com 8 exons e 7 introns. Ele se liga ao Flt-1 (também chamado de VEGFR1) e ao flk1 (também denominado KDR ou VEGFR2), ambos receptores da tirosina quinase presentes na membrana das células endoteliais (Terman, 1992). VEGF-A pertence a uma família genética que inclui o fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Apesar de

apresentarem estruturas semelhantes, eles têm atividades biológicas diferentes, principalmente pela especificidade de cada receptor já reconhecido. Até o momento, 6 isoformas do genoma humano do VEGF foram observadas, do aminoácido 121 ao 206. Alguns polimorfismos do gene do VEGF foram identificados, sendo denominados de acordo com a posição em que ocorrem, tais como o -460 C/T, -634 C/G, +936 C/T, -1154 G/A (rs1570360), -2578 C/A (rs699947) (Brogan et al., 1999; Renner et al., 2000; Watson et al., 2000; Awata et al., 2002).

Estudos demonstraram a correlação entre polimorfismos do gene do VEGF com algumas doenças tais como a Doença de Behçet (Salvarani et al., 2004), a endometriose (Hsieh et al., 2004; Kim et al., 2005; Bhanoori et al., 2005), e vários tipos de câncer. Entre eles destacamos o de mama (Krippel et al., 2003; Smith et al., 2004; Lu et al., 2005; Jin et al., 2005; Kataoka et al., 2006; Jacobs et al., 2006; Schneider et al., 2007; Balasubramanian et al., 2007; Langsenlehner et al., 2007) e o de ovário (Hefler et al., 2007). Nosso interesse no estudo de polimorfismos de VEGF em pacientes com GE também é movido por este fato, já que na GE muitas vezes a agressividade do trofoblasto e sua invasão na parede da tuba simula uma doença neoplásica, inclusive respondendo a quimioterápicos. Na área de Obstetrícia foi observado associação entre polimorfismo do VEGF e pré-eclâmpsia (Papazoglou et al., 2004b; Bányász et al., 2006; Shim et al., 2007), trabalho de parto prematuro (Papazoglou et al., 2004a) e abortamento habitual (Papazoglou et al., 2005). Destacando-se o polimorfismo de VEGF (+936C/T) e parto prematuro (Papazoglou et al., 2004a), a associação entre a presença do alelo 936T e o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (Hayman et al., 1999; Papazoglou et al., 2004b; Baumwell, Karumanchi, 2007) e entre o polimorfismo de VEGF -1154 G/A com o abortamento habitual (Coulam et al., 2008).

Lam et al., (2004), estudando 10 pacientes submetidas a salpingectomia por GE, observaram que a expressão do RNAm do VEGF e de seus receptores (KDR e flt-1) estavam significativamente aumentados no local de implantação da gravidez ectópica

na tuba em comparação com os outros segmentos. Estes resultados são concordantes com a hipótese de que o VEGF participe da fisiopatologia da GE, inclusive no que tange à expressão gênica no local de implantação e, desse modo, pode representar um parâmetro importante para diagnóstico e tratamento desta patologia.

INTRODUÇÃO

Considerando as diversas observações que sugerem a participação do VEGF no desenvolvimento da gravidez ectópica, associado ao fato de que muitas pacientes com este diagnóstico não apresentam nenhum fator de risco específico para esta doença, nossa intenção é investigar a relação entre o polimorfismo de VEGF e a ocorrência de GE.

2 PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como desígnio a análise do fator de crescimento vaso-endothelial como marcador sorológico no diagnóstico da gravidez ectópica. Avaliando seus valores séricos em casos de gravidez ectópica, abortamento e gestação intra-uterina viável.

Foi desiderato, também, desta tese avaliar se as variantes polimórficas - 460 T/C (rs833061), -634 C/G (rs2010963) e +936 C/T (rs3025039) do gene do fator de crescimento vaso-endothelial podem estar associadas à ocorrência da gravidez ectópica.

Outrossim, este estudo avaliou a correlação do genótipo de polimorfismos do gene de VEGF com os valores séricos do fator de crescimento vaso-endothelial nas pacientes com gravidez ectópica.

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1. Desenho do estudo

Estudo do tipo caso-controle realizado no Departamento de Obstetrícia da UNIFESP. Para cumprir nossos objetivos selecionamos quatro grupos de estudo: grupo VEGF, grupo VEGF controle, grupo polimorfismo e grupo polimorfismo controle.

No **grupo VEGF** foram incluídas 35 pacientes na vigência de gravidez ectópica, que seriam submetidas ao tratamento cirúrgico, terapêutica clínica com metotrexato ou conduta expectante e que também fazem parte do grupo polimorfismo.

O **grupo VEGF controle** foi constituído por 22 gestações tópicas viáveis e 15 abortamentos com idade gestacional de até 8 semanas.

Os critérios de exclusão do grupo marcador sorológico foram gestação ectópica de localização atípica (cervical, intersticial, ovariana, cicatriz de cesárea e abdominal) e os casos onde a ultrassonografia não visualizou a gestação tubária.

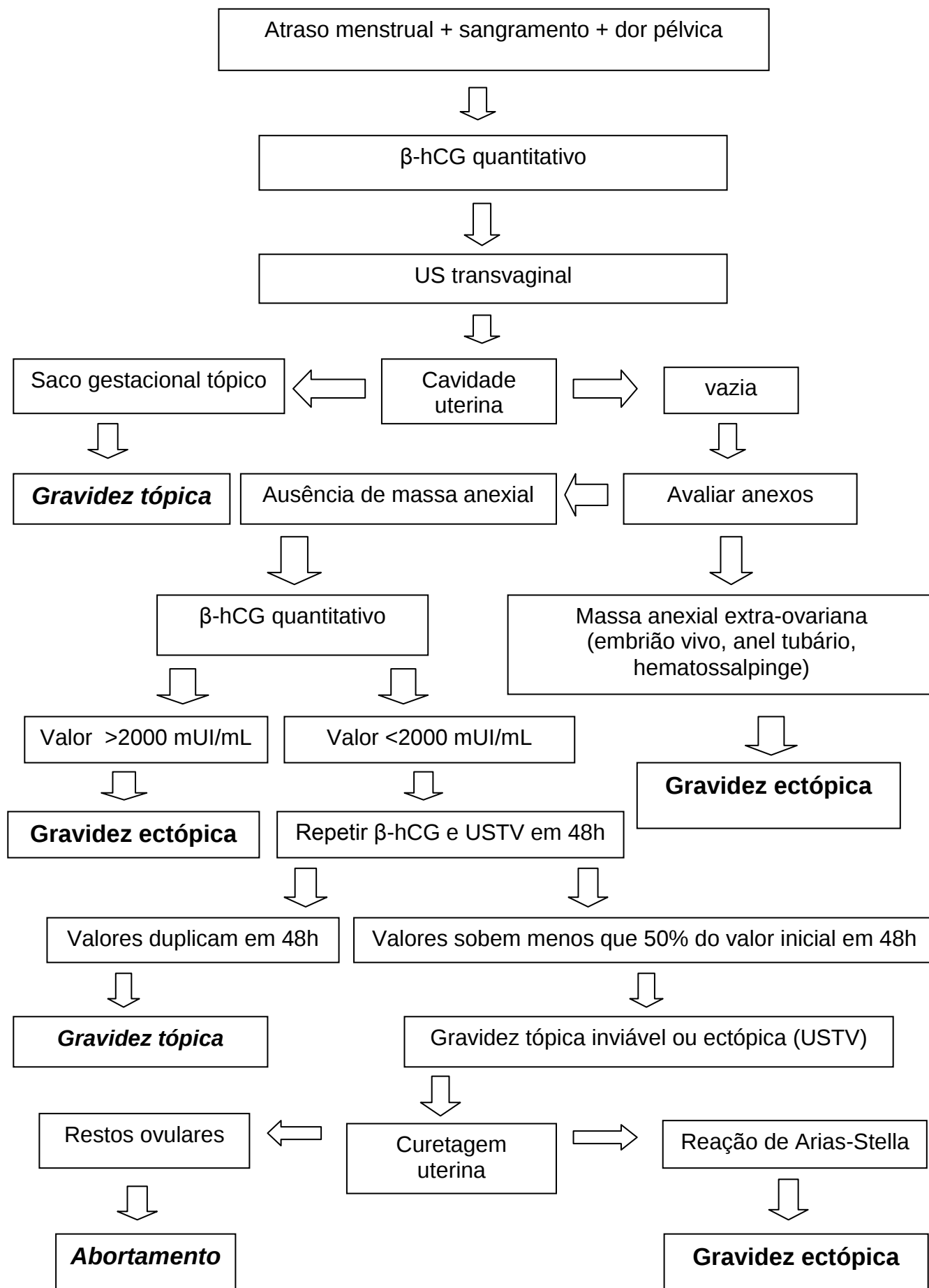
O **grupo polimorfismo** foi composto por 75 casos que respeitassem os seguintes critérios de inclusão:

- História prévia de gravidez ectópica em acompanhamento no Ambulatório de Gravidez Ectópica do Departamento de Obstetrícia da UNIFESP.
- Pacientes na vigência de gravidez ectópica, que seriam submetidas ao tratamento cirúrgico, terapêutica clínica com metotrexato e conduta expectante.

Finalmente o **grupo controle polimorfismo** foi formado por 134 pacientes na pós-menopausa, em acompanhamento no Ambulatório de Climatério da UNIFESP, que não tiveram gravidez ectópica e apresentaram pelo menos duas gravidezes normais.

O diagnóstico da gravidez ectópica foi baseado no protocolo de diagnóstico não invasivo utilizado no Departamento de Obstetrícia da UNIFESP conforme o seguinte esquema (figura 6).

Figura 1: Protocolo de Diagnóstico Não Invasivo de Gravidez Ectópica do Departamento de Obstetrícia da UNIFESP:



3.2. Cálculo do tamanho amostral do grupo VEGF e VEGF controle:

Considerando-se um risco $\alpha = 5\%$; poder = 80% e percentual de exposição no grupo controle **de 10%**; estimamos (Fleiss, 1981) :

Quadro 1: cálculo do tamanho amostral dos grupos VEGF e VEGF controle com percentual de exposição no grupo controle de 10%:

Risco Esperado	1 : 1		
	Casos	Controles	Total
3,0	56	56	112
3,5	42	42	84

Portanto: de acordo com os parâmetros selecionados:

- risco $\alpha = 5\%$;
- poder = 80%;
- percentual de exposição no grupo controle de 10%;
- risco esperado a ser obtido de 3,5 vezes para que o os valores séricos de VEGF sejam um fator de risco independente
- **1 caso; 1 controle:**

Tamanho aproximado da amostra = 42 casos e 42 controles

3.3. Cálculo do tamanho amostral do grupo polimorfismo e polimorfismo controle:

Considerando-se um risco $\alpha = 5\%$; poder = 80% e percentual de exposição no grupo controle **de 10%**; estimamos (Fleiss, 1981) :

Quadro 2: cálculo do tamanho amostral dos grupos polimorfismo e polimorfismo controle com percentual de exposição no grupo controle de 10%:

Risco Esperado	1 : 1 Casos Controles Total		
3,0	112	112	224
3,5	84	84	168

Portanto: de acordo com os parâmetros selecionados:

- risco α = 5% ;
- poder=80%;
- percentual de exposição no grupo controle de 10%;
- risco esperado a ser obtido de 3,5 vezes para que o polimorfismo seja um fator de risco independente
- **1 caso; 1 controle:**

Tamanho aproximado da amostra = 84 casos e 84 controles

3.4. Aspectos éticos

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo em 24 de março de 2003 e aditivo do projeto inicial em 7 de dezembro de 2007 sob nº 1612/07 (anexo 1).

3.5. Método

Após o consentimento informado da paciente (termo de consentimento assinado – anexos 3 e 4), foram coletados 10 ml em tubo seco, centrifugados a 2000 rpm e o sobrenadante foi separado em cinco alíquotas de 200 μ L e armazenados a -80 ° C, para posterior dosagem do VEGF (grupos VEGF e controle VEGF).

Outros 10 mL de sangue foram coletados por punção venosa em tubo com EDTA, nos grupos polimorfismo e controle polimorfismo. Após centrifugação a 2000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e a camada superior contendo as células polimorfonucleares foi coletada (1000µL) e estocada a -20°C para posterior extração de DNA.

- Metodologia do grupo VEGF e VEGF controle:

O grupo marcador sorológico VEGF foi composto de pacientes com diagnóstico de gravidez ectópica com idade gestacional inferior a 8 semanas que foram internadas pelo Pronto Socorro do Hospital São Paulo. No grupo controle recrutamos gestações tópicas viáveis sem intercorrências e casos de abortamento confirmados pela ultrassonografia, ambos com idade gestacional inferior a 8 semanas.

O diagnóstico de abortamento foi realizado através da ultrassonografia transvaginal. Os sinais ecográficos de gestação inviável que foram considerados no estudo são: ausência de batimentos cardíacos em embrião com comprimento cabeça-nádega (CCN) > 5 mm; ausência de vesícula vitelínica em saco gestacional com diâmetro médio > 8 mm; ausência de embrião visível em saco gestacional > 16 mm; saco gestacional com forma irregular, anômala e grosseiramente distorcida; saco gestacional anormalmente pequeno; implantação baixa do saco gestacional; reação decidual com ecogenicidade reduzida e ausência do sinal do duplo halo. Mediante tais alterações ultrassonográficas solicitávamos nova avaliação pela USTV em 48 a 72 horas, caso não ocorressem alterações confirmávamos o diagnóstico de abortamento.

O diagnóstico de gestação tópica viável é realizado pela ultra-sonografia transvaginal demonstrando embrião vivo.

Análise laboratorial

Após o consentimento informado da paciente (termo de consentimento assinado – anexo 4), foram coletados 10 ml de sangue em tubo seco antes de iniciado o tratamento.

Aguardamos a retração do coágulo a temperatura ambiente, e este foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O soro sobrenadante foi coletado e alicotado, todas as amostras foram armazenadas a -80° C para posterior dosagem do VEGF.

A dosagem sérica do VEGF foi medida por teste comercial de ELISA (human VEGF; R&D systems, Minneapolis) específico para moléculas humanas. Todas dosagens do VEGF foram realizadas no mesmo dia e em duplicata. Os coeficientes de variação inter-ensaios e intra-ensaios são de < 8,8% e < 6,7%, respectivamente. A sensibilidade do teste é de <5 pg/mL.

- Análise estatística do grupo VEGF e VEGF controle:

As concentrações séricas de VEGF foram comparadas em cada subgrupo por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com correção de Bonferonni. Os resultados foram considerados significantes quando p foi inferior a 0,05. O valor de corte de VEGF sérico superior a 200 pg/mL foi utilizado para discriminar a gravidez intra-uterina da GE, avaliando-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSSr12.

- Metodologia do grupo polimorfismo e polimorfismo controle:

O DNA foi extraído pela técnica Brometo de dodeciltrimetilamônio / Brometo de Cetiltrimetilamônio (Gustincich et al, 1991):

As amostras foram incubadas em 450µL de Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) 12% por 5 minutos a 65°C e homogeneizadas por inversão em intervalos de 1 minuto. Após a adição de 900µL de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi depositado em microtubo, contendo 900µL de água para injeção e 100µL de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) 5%, o material foi homogeneizado suavemente e submetido à nova centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm para formação do botão.

O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 300 μ L de Cloreto de Sódio 1,2M (NaCl). O botão foi totalmente diluído, em seguida, foram acrescentados 750 μ L etanol 95%.

Após precipitação do DNA, o material foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 1mL de etanol 70%. Após nova centrifugação (2 minutos/13.000rpm), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 120 μ L de água para injeção. O material foi incubado em banho-seco a 65°C por 10 minutos. Após leitura óptica em espectrofotômetro Beckman DU 640, específico para leitura de amostras de DNA, a concentração de DNA foi ajustada em 20ng/ μ L, as alíquotas foram estocadas a -20°C para posterior amplificação e avaliação.

Reação em cadeia de polimerase (PCR) para determinação dos polimorfismos de VEGF

A primeira etapa foi definir os *primers* que foram utilizados. Baseados em pesquisas na literatura, foram selecionados os *primers* apresentados a seguir (Hsieh et al., 2004; Papazoglou et al., 2004a; Papazoglou et al., 2004b):

a) Para identificação de polimorfismo do gene de VEGF -460 T/C:

Sense: 5' TGT GCG TGT GGG GTT GAG CG 3'

Anti-sense: 5' TAC GTG CGG ACA GGG CCT GA 3'

b) Para identificação de polimorfismo do gene de VEGF -634 C/G:

Sense: 5' ATT TAT TTT TGC TTG CCA TT 3'

Anti-sense: 5' GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA 3'

c) Para identificação de polimorfismo do gene de VEGF +936 C/T

Sense: 5' AAG GAA GAG GAG ACT CTG CGC AGA GC 3'

Anti-sense: 5' TAA ATG TAT GTA TGT GGG TGG GTG TGT CTA CAG 3'

Polimorfismo do gene do VEGF -460 T/C

A padronização da técnica foi baseada nos experimentos realizados por Hsieh et al., 2004. De acordo com este protocolo foi utilizada a enzima de restrição *BstU* (New

England Biolabs, Uniscience do Brasil) que permite a detecção de fragmentos de 175 pares de bases (bp), 155bp e 20bp. Assim foram definidos os genótipos:

TT - corresponde a detecção de um fragmento de 175bp;

TC - corresponde a detecção de três fragmentos: 175bp, 155bp e 20bp ;

CC - corresponde a detecção de dois fragmentos :155bp e 20bp

Metodologia aplicada:

Pré-PCR: Foram misturados 11 μ L Master Mix (Promega, Prodimol) 11 μ L *Nuclease Free Water* (Promega, Prodimol), 1 μ L do *pool* de primers sense 5'- TGT GCG TGT GGG GTT GAG CG - 3' e anti-sense 5'- TAC GTG CGG ACA GGG CCT GA 3' em concentração de 10nM cada e 2 μ L da amostra de DNA a ser estudada. Como controle negativo, foi adicionado *Nuclease Free Water* em substituição a amostra de DNA.

PCR: os microtubos foram acomodados em termociclador (Applied Biosystem) e submetidos ao protocolo descrito:

Quadro 3: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF -460 T/C:

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	35 ciclos
62°C	1 minuto	35 ciclos
72°C	20 segundos	35 ciclos
72°C	10 minutos	1 ciclo
4°C	∞	---

Eletroforese em Gel de Agarose a 2%: os produtos de PCR foram misturados a 1 μ L de *Blue Juice* (Invitrogen), aplicados em gel de agarose 2% e submetidos à eletroforese (90 volts por 40 minutos). Posteriormente, o gel foi analisado com auxílio de transluminador de luz ultravioleta. O produto de amplificação encontrado foi

fragmento de 175bp, identificado com o auxílio de marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen).

Digestão Enzimática: foram misturados, 12 μ L de produto final da PCR, 1 μ L de enzima de restrição *BstU* (*New England Biolabs*, Uniscience do Brasil) e 2 μ L de solução tampão. As amostras foram incubadas a 60°C por 16 horas. Na sequência, 5 μ L da amostra foram aplicados em gel de agarose 3% e submetidos a eletroforese a 90 volts por 40 minutos. De acordo com o esperado foram identificados os fragmentos de 175bp, 155 bp e 20 bp nas diferentes amostras, permitindo a caracterização dos genótipos TT, TC e CC (figura 2).

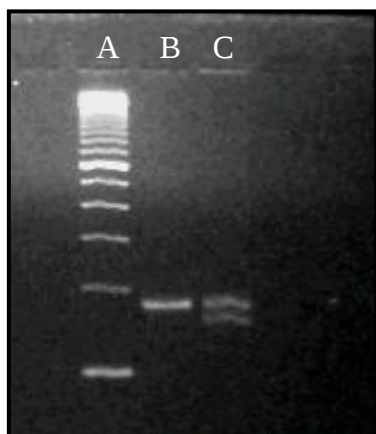


Figura 2: Exemplo de polimorfismo do gene do VEGF -460 T/C em gel de agarose:

A: marcador de peso molecular;

B: amplificação do produto de PCR fragmento de 175bp;

C: digestão enzimática, fragmento de 175bp e 155bp.

Polimorfismo do gene do VEGF -634 C/G

Foi utilizado o protocolo descrito por Papazoglou et al., 2004a. De acordo com este protocolo, utiliza-se a enzima de restrição *BsmFI* (*New England Biolabs*, Uniscience do Brasil) que permite a detecção de fragmentos de 304 bp, 193bp e 111bp. Assim foram definidos os genótipos:

PACIENTES E MÉTODO

CC - corresponde a detecção de um fragmento de 304 bp;

CG - corresponde a detecção de um fragmento de 304bp 193bp e 111bp;

GG - corresponde a detecção de um fragmento de 193bp e 111bp

Metodologia aplicada:

Pré-PCR: foram acrescentados 11 μ L Master Mix (Promega, Prodimol) 11 μ L *Nuclease Free Water* (Promega, Prodimol), 1 μ L do *pool* de primers sense 5' ATT TAT TTT TGC TTG CCA TT 3' e anti-sense 5' GTC TGT CTG TCT GTC CGT CA 3' em concentração de 10nM cada e 2 μ L da amostra de DNA a ser estudada. Como controle negativo foi adicionada *Nuclease Free Water* em substituição a amostra de DNA.

PCR: Os microtubos foram acomodados em termociclador (Applied Biosystem) e submetidos ao protocolo abaixo descrito:

Quadro 4: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF -634 C/G:

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	40 segundos	35 ciclos
49,2°C	1 minuto	35 ciclos
72°C	40 segundos	35 ciclos
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	---

Eletroforese em Gel de Agarose a 2%: Os produtos de PCR foram misturados a 1 μ L de *Blue Juice* (Invitrogen), aplicados em gel de agarose 2% e submetidos a eletroforese (90 volts por 40 minutos). Posteriormente, o gel foi analisado com auxílio de transluminador de luz ultravioleta.

Digestão enzimática:

Segundo o método descrito por Papazoglou e colaboradores em 2004: foram misturados, 8µL de produto final da PCR, 1µL de enzima de restrição *BsmFI* (New England Biolabs, Uniscience do Brasil), 2µL de solução tampão e 0,5µL de BSA. As amostras foram incubadas a 65°C por 3 horas. Na sequência, 5µL da amostra foram aplicados em gel de agarose 2% e submetidos à eletroforese a 90 volts por 40 minutos.

Este protocolo permitiu a obtenção dos resultados esperados. Neste exemplo pode-se identificar os seguintes fragmentos 304bp, 193bp e 111bp, caracterizando o genótipo CG (figura 3).

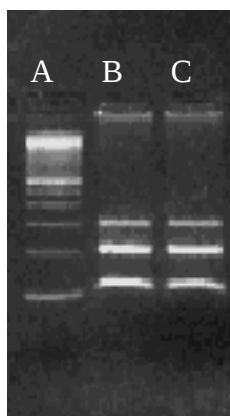


Figura 3: exemplo de polimorfismo do gene do VEGF -634 C/G em gel de agarose:

A: Marcador de peso molecular;

B e C: digestão enzimática, fragmentos de 304bp, 193bp e 111bp.

Polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T

Foi utilizado o protocolo descrito por Papazoglou et al., 2004a. De acordo com este protocolo utiliza-se a enzima de restrição *NlaIII* (New England Biolabs, Uniscience do Brasil) que permite a detecção de fragmentos de 208 bp, 122 bp e 88 bp. Assim podem ser definidos os genótipos:

CC - corresponde a detecção de um fragmento de 208 bp;

CT - corresponde a detecção de um fragmento de 208bp 122bp e 88bp;

TT - corresponde a detecção de um fragmento de 122bp e 88bp

Metodologia aplicada:

Pré-PCR: Foi adicionado 11 μ L Master Mix (Promega, Prodimol) 11 μ L *Nuclease Free Water* (Promega, Prodimol), 1 μ L do *pool* de primers sense - AAG GAA GAG GAG ACT CTG CGC AGA GC 3' e anti-sense 5' TAA ATG TAT GTA TGT GGG TGG GTG TGT CTA CAG 3' em concentração de 10nM cada e 2 μ L da amostra de DNA a ser estudada. Como controle negativo, foi adicionado *Nuclease Free Water* em substituição a amostra de DNA.

PCR: Os microtubos foram acomodados em termociclador (Applied Biosystem) e submetidos ao protocolo abaixo descrito:

Quadro 5: ciclos de PCR para polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T:

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	35 ciclos
62°C	1 minuto	35 ciclos
72°C	20 segundos	35 ciclos
72°C	10 minutos	1 ciclo
4°C	∞	---

Eletroforese em Gel de Agarose a 2%: os produtos de PCR foram misturados a 1 μ L de *Blue Juice* (Invitrogen), aplicados em gel de agarose 2% e submetidos à eletroforese (90 volts por 40 minutos). Posteriormente, o gel foi analisado com auxílio de transluminador de luz ultravioleta. O produto de amplificação encontrado foi

PACIENTES E MÉTODO

fragmento de 208bp, identificado com marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen).

Digestão Enzimática: foram misturados 12 μ L do produto final da PCR, 1 μ L de enzima de restrição *NlaIII* (*New England Biolabs*, Uniscience do Brasil) 2 μ L de solução tampão e 0,5 μ L de BSA. As amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas; a seguir 5 μ L deste produto foram aplicados em gel de agarose 3% e submetidos a eletroforese (90 volts por 40 minutos). De acordo com o esperado foram identificados os fragmentos de 208bp, 122bp e 88bp nas diferentes amostras, permitindo a caracterização dos genótipos TT, TC e CC (figura 4).

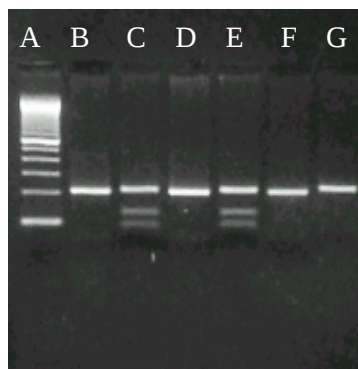


Figura 4: exemplo de polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T em gel de agarose:

A: Marcador de peso molecular;

B, D e F: Produto de PCR (208bp);

C, E: digestão enzimática, fragmentos de 208pb, 122pb e 88pb.

G: digestão enzimática, fragmentos de 208pb.

Seguindo este protocolo foi possível amplificar o DNA com a obtenção de fragmentos de peso molecular esperado.

- Análise estatística do grupo polimorfismo e polimorfismo controle:

O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado calculando-se as frequências esperadas para cada genótipo e comparando-as com os valores observados.

As diferenças do genótipo do VEGF e da frequência dos alelos entre o grupo de estudo e o grupo controle foi analisado pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

A exploração dos resultados pode ser feita considerando-se diferentes modelos genéticos (dominante, recessivo e co-dominante) (Pearson, Manolio, 2008).

Para os polimorfismos do gene -460C/T e -634C/G de VEGF optamos pelos modelo dominante e codominante. Para a análise do polimorfismo +936C/T de VEGF assumimos apenas o modelo dominante.

Realizamos a correlação do genótipo dos polimorfismos dos genes de VEGF com os resultados séricos do VEGF utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney e Kruskal Wallis.

A probabilidade (p) menor do que 0,05 foi considerada para indicar significância estatística; todos os testes foram bicaudados. A análise foi realizada segundo o pacote estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Science) 13.1 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1. Características da Amostra Grupo VEGF e VEGF controle:

Foi realizada a dosagem de VEGF sérico em 35 pacientes com GE, 15 abortamentos e 22 gestações intra-uterinas normais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela I e gráfico 1. Comparando os valores obtidos observamos que as pacientes com GE apresentaram níveis significativamente mais elevados de VEGF sérico do que o grupo controle de gestações intra-uterinas normais.

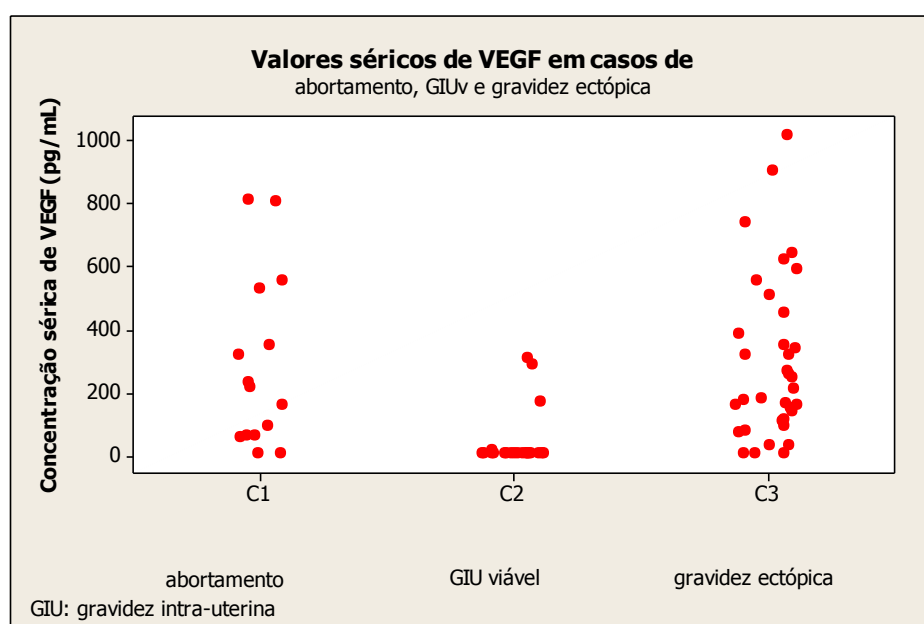
Tabela I. Valores séricos do VEGF na gravidez ectópica, abortamento e gestação intra-uterina normal. Valores apresentados pela mediana

VEGF (pg/ml)	Gravidez Ectópica(n = 35)	Aborto (n = 15)	GIUv (n = 22)
Média	297,5	299,6	39,9
Desvio Padrão	259,4	278,3	91,4
Mediana	211,1	231,9	5
Min	5	5	5
Max	1017	813,7	310,6

$P < 0.0001$ entre gestação intrauterina viável e os outros dois grupos (GE e abortamento).

GIUv: gestação intra-uterina viável

Gráfico 1- Concentração de VEGF sérico nos casos de abortamento, gestação intra-uterina viável (GIUv) e gravidez ectópica (GE):



Quando utilizamos o valor de corte de 200 pg/mL, a gravidez ectópica pode ser discriminada de uma gravidez intrauterina viável com sensibilidade de 51,4 %, especificidade de 90,9%, valor preditivo positivo de 90% e valor preditivo negativo de 51,1%. Entre GE e abortamento, sensibilidade de 51,4%, especificidade 42,8%, valor preditivo positivo de 69,2% e valor preditivo negativo de 26,1%. Quando comparamos a gravidez intrauterina viável com a gravidez inviável (gravidez ectópica e abortamento), a sensibilidade foi de 53%, a especificidade de 90,9%, valor preditivo positivo de 92,9% e valor preditivo negativo de 46,5%.

4.2. Avaliação genética

a) Polimorfismo -634C/G do gene de VEGF

Para a avaliação do polimorfismo -634C/G do gene de VEGF, selecionamos 74 amostras do grupo caso e 134 do grupo controle.

A distribuição das frequências desse polimorfismo estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos.

Utilizando um modelo de herança co-dominante, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao polimorfismo -634 C/G do gene de VEGF: $\chi^2(2) = 3,537$; $P = 0,171$.

Em relação às frequências alélicas desse polimorfismo, também não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os casos de gravidez ectópica e controles ($p = 0,249$)

Tabela II. . Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634G/C em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.

Polimorfismo -634 G/C	Gravidez ectópica	Controle
GG (%)	35 (47,3%)	47 (35,1%)
CG (%)	29 (39,2%)	70 (52,2%)
CC (%)	10 (13,5%)	17 (12,7%)
Total	74	134
HW	0,98	1,33
pX²	0,17	
Frequência de alelos		
G	99 (66,9%)	164 (61,2%)
C	49 (33,1%)	104 (38,8%)
P	0,249	

HW: Hardy-Weinberg

b) Polimorfismo -460 C/T do gene do VEGF

Para a avaliação do polimorfismo -460 C/T do gene de VEGF, selecionamos 74 amostras do grupo caso e 134 do grupo controle, resultando em, respectivamente, 68 e 49 genotipagens. As demais amostras foram perdidas devido a dificuldades técnicas de amplificação e digestão enzimática.

A distribuição das frequências desse polimorfismo estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos.

Utilizando um modelo de herança co-dominante, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao polimorfismo -460 C/T do gene de VEGF: $\chi^2(2) = 0,697$; $P = 0,706$.

Em relação às frequências alélicas desse polimorfismo, também não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os casos de gravidez ectópica e controles ($p = 0,468$)

Tabela III. Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo 460C/T em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.

Polimorfismo VEGF -460 C/T	Gravidez ectópica	Controle
CC (%)	20 (29,4%)	18 (36,7%)
CT (%)	34 (50,0%)	22 (44,9%)
TT (%)	14 (20,6%)	9 (18,4%)
Total	68	49
HW	0,004	0,24
pX ²	0,70	
Frequência de alelos		
C	74 (54,4%)	58 (59,2%)
T	62 (45,6%)	40 (40,8%)
pX ²	0,468	

HW: Hardy-Weinberg

c) Polimorfismo +936C/T do gene de VEGF:

Para análise do polimorfismo +936C/T do gene de VEGF, das 75 amostras do grupo caso, conseguimos resultados satisfatórios em 74. Do grupo controle, selecionamos 134 amostras, com 120 resultados adequados. As amostras foram perdidas, principalmente, devido a falhas de amplificação.

A distribuição das frequências do polimorfismo +936C/T do gene de VEGF estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) nos dois grupos.

Utilizando um modelo de herança co-dominante, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao polimorfismo +936 C/T do gene de VEGF: $\chi^2(1) = 1,143$; $P = 0,285$.

RESULTADOS

Em relação às frequências alélicas desse polimorfismo, também não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os casos de gravidez ectópica e controles ($p=0,316$)

Tabela IV. Distribuição dos genótipos e alelos do gene de VEGF quanto ao polimorfismo +936C/T em pacientes com gestação ectópica e grupo controle.

Polimorfismo +936C/T	Gravidez ectópica	Controle
CC (%)	55 (74,3%)	97 (80,8%)
CT (%)	19 (25,7%)	23 (19,2%)
TT (%)	0	0
Total	74	120
HW	1,60	1,34
pX²	0,285	
Frequência de alelos		
C	129 (87,2%)	217 (90,4%)
T	19 (12,8%)	23 (9,6%)
P	0,316	

HW: Hardy-Weinberg

4.3. Avaliação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF com os valores séricos do VEGF

Foi realizada a análise do genótipo do polimorfismo dos genes -460 C/T, -634 G/C, +936 C/T e correlacionada com os valores do VEGF sérico das 35 pacientes na vigência da gravidez ectópica.

Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas VI, VII e VIII. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e os valores séricos do VEGF.

Tabela V- Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -460C/T em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.

VEGF (pg/ml)	Genótipo 460 CC	Genótipo 460 CT	Genótipo 460 TT
Média	243,8	289,4	462,7
Desvio Padrão	194,5	271,6	304,4
Mínimo	5	5	74,3
Máximo	556,3	1017	505,2
Mediana	178,5	164,1	453,3
P=0,3474			

Tabela VI- Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo -634 C/G em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.

VEGF (pg/ml)	Genótipo 634 GG	Genótipo 634 CG	Genótipo 634 CC
Média	349,9	285,0	248,0
Desvio Padrão	272,6	287,9	154,1
Mínimo	5	5	80,6
Máximo	905,2	1017	507,5
Mediana	288,6	170,25	194,0

P=0,7026

Tabela VII- Comparação do genótipo do polimorfismo do gene de VEGF quanto ao polimorfismo +936C/T em pacientes com gestação ectópica com os resultados do VEGF sérico.

VEGF (pg/ml)	Genótipo 936 CC	Genótipo 936 CT
Média	268,85	445,62
Desvio Padrão	223,77	351,4
Mínimo	5	106
Máximo	905,2	1017
Mediana	211,1	317,3

P=0,2565

Em uma época onde a Medicina caminha para a valorização e ampliação de métodos diagnósticos, quando a detecção precoce e a intervenção terapêutica se colocam como um dos pilares da prática médica, a gravidez ectópica ainda é intercorrência frustrante para médicos e pacientes, uma vez que é a principal causa de morte materna no primeiro trimestre da gestação.

Diversos autores levantaram a hipótese de que as condições de hipóxia e desfavoráveis no local de implantação da tuba de Falópio em pacientes com gravidez ectópica poderiam estimular o trofoblasto a produzir e secretar quantidades aumentadas de VEGF (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002; Daponte et al., 2005). Daniel et al., (1999) foram os primeiros a relatar que os valores séricos estavam aumentados nos casos com gravidez ectópica quando comparados aos de gravidez intra-uterina.

No nosso estudo ficou evidente que nos casos de gravidez ectópica os valores séricos do VEGF estavam aumentados em comparação com as gestações intra-uterinas viáveis sendo estes resultados estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). A mediana da concentração sérica de VEGF nos casos de GE foi (211,1pg/mL; n=35), que foram similares aos obtidos por Daniel et al., 1999 (226,8pg/ mL; n=20), por Kucera-Sliutz et al., 2002 (211,2 pg/mL; n=42), por Mueller et al., 2004 (203,6pg/mL; n=43), por Daponte et al., 2005 (227,2pg/mL; n=27) e diferiram do estudo de Ugurlu et al., 2009 (55,2pg/mL; n=28).

A comparação dos valores séricos de VEGF entre a gravidez ectópica e a gravidez intrauterina viável em diversos estudos demonstrou que os valores estavam aumentados na GE (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002 e Mueller et al., 2004), dados que estão em concordância com nosso estudo. Entretanto, outros autores não observaram diferença entre esses dois grupos (Ugurlu et al., 2009 e Gerton et al., 2004).

Poder usufruir de outra ferramenta além da β -hCG e da ultrassonografia transvaginal ajudará na elucidação dos casos atípicos onde não se tem certeza da localização da gravidez, especialmente quando a idade gestacional for inferior a 8 semanas; período onde o diagnóstico ultrassonográfico pode ser mais difícil e a sensibilidade da dosagem do VEGF costuma ser maior (Kucera-Sliutz et al., 2002).

Nossos resultados demonstraram que os valores séricos de VEGF são mais elevados nos casos de GE em relação à gravidez intra-uterina viável, desta forma o clínico poderia suspeitar do diagnóstico de GE quando os valores de VEGF forem aumentados.

O ponto fundamental no diagnóstico dos sangramentos do primeiro trimestre de gestação é discriminar entre GE e abortamento. Alguns estudos evidenciaram que os valores de VEGF foram mais elevados nos casos de GE em comparação com abortamento (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2002 e Daponte et al., 2005).

Em nosso estudo, quando comparamos os valores de VEGF na gravidez ectópica com os casos de abortamento não encontramos diferença estatisticamente significativa. Estes dados demonstraram que os valores séricos do VEGF não podem diferenciar os casos de gravidez inviável, isto é, ectópica do abortamento. Em ambas as situações as dosagens sérica de VEGF estiveram mais elevadas quando comparadas com a gravidez intra-uterina viável. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Kucera-Sliutz et al (2002) que comparou apenas dois grupos de estudo, um de abortamento (mediana 198,5 pg/mL) e outro de gravidez ectópica (mediana 211,2 pg/mL). Outro estudo de Ugurlu et al. (2008) obtiveram resultados de VEGF baixo nos grupos estudados gravidez ectópica (55,2 pg/mL) e abortamento (26,2 pg/mL), concluíram no seu estudo que o VEGF não pode diferenciar a gravidez ectópica do abortamento como demonstrado em nosso estudo. A literatura demonstra divergência em relação aos resultados dos trabalhos. A nossa casuística contribuirá com a literatura pertinente ao tema e aumentará a consistência dos resultados.

Felemban et al., 2002, utilizando o valor de corte do VEGF maior que 200 pg/mL pode diferenciar a GE da gravidez intra-uterina viável com sensibilidade de 88%, especificidade de 100%, e valor preditivo positivo (VPP) de 100%; enquanto em nosso estudo, os valores correspondentes foram 51,4%, 90,9% e 90% respectivamente. Para discriminar GE do abortamento, Daniel et al., 1999, obtiveram sensibilidade de 60%, especificidade de 80% e VPP 86%. Os valores correspondentes do estudo de Kucera-Sliutz et al., 2002, foram 56,1%, 51,2% e 53,5%. No nosso estudo, para distinguir a gravidez ectópica do abortamento, encontramos sensibilidade de 51,4%, especificidade de 42,8% e VPP de 69,2%. De acordo com nossos resultados, o valor sérico de VEGF maior que 200 pg/mL pode discriminar a GE da gravidez viável com especificidade de 90,9% e VPP de 90%. Por outro lado, nossa pesquisa demonstrou baixa especificidade

DISCUSSÃO

para diferenciar a GE do abortamento. Com intuito de fazer diagnóstico diferencial de gravidez viável com gravidez inviável (abortamento e GE), os valores de VEGF superiores a 200 pg/mL demonstraram VPP de 92,9%.

Atualmente o que utilizamos para o diagnóstico de gravidez ectópica são as dosagens da β -hCG e da ultra-sonografia transvaginal. A β -hCG numa amostra isolada não diferencia a gravidez viável da inviável é necessária nova amostra após 48 horas, caso os títulos subam menos do que 50% do valor inicial a possibilidade de ser gravidez inviável é grande. Desta forma os valores de VEGF superiores a 200 pg/mL em amostra isolada têm capacidade de discriminar a gravidez inviável da viável com VPP de 92,9%. Só este dado já alerta o clínico na elaboração do seu diagnóstico, pois ele sinaliza os casos de maior risco (GE e abortamento).

A busca por marcador específico deve ser aprofundada com o objetivo de reduzir o diagnóstico tardio da gravidez ectópica. Sendo linha de pesquisa vasta para futuros estudos.

É importante salientar que a ultra-sonografia transvaginal utilizada na rotina diagnóstica da GE demonstrou elevada sensibilidade (90,9%), especificidade (99,9%) e VPP (93,5%) elevados para detectar GE (Condous, 2005). Além disto, com o desenvolvimento de aparelhos de ultra-sonografia cada vez melhores, o papel da USTV pode se tornar superior aos marcadores séricos.

A confirmação em nosso estudo de que o VEGF está aumentado na gravidez ectópica, dados já demonstrados por trabalhos anteriores (Daniel et al., 1999; Felemban et al., 2001 e Daponte et al., 2005) nos motivaram a pesquisar o polimorfismo do gene do VEGF para identificar se a população de pacientes com GE teria alteração deste polimorfismo.

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento dramático de descobertas genéticas envolvendo doenças complexas, com aproximadamente 40 *loci* descritos para mais de 100 doenças, identificadas e reproduzidas em estudos de associação genética. Esses estudos têm habitualmente desenho caso-controle e podem fornecer resultados interessantes mesmo para doenças raras, desde que sejam bem definidos os critérios de seleção dos grupos (Romero et al., 2002; Pearson, Manolio, 2008).

O tamanho da amostra necessário para testar a associação entre uma variação de DNA e determinada doença é questão importante a ser considerada. A estimativa

DISCUSSÃO

do número de indivíduos é influenciada pela frequência do polimorfismo na população. Devido à dificuldade em se obter número elevado de amostras, erro beta de 20% e alfa de 5% geralmente são aceitáveis para o cálculo amostral. Aumentar o número de controles é um artifício que aumenta o poder do teste (Romero et al., 2002).

Atualmente, dados sobre estudos de associação genética e gravidez ectópica são escassos, portanto não temos base de comparação porque até o momento não acusamos nenhum estudo de polimorfismos do gene de VEGF e gravidez ectópica. Amostras consistentes certamente melhoram a análise, mas a dificuldade na obtenção dos casos, o custo financeiro e o tempo necessário para a execução dos exames laboratoriais precisam ser considerados. A análise dos dados deve ser cautelosa e os resultados devem ser considerados sugestivos, devendo ser confirmados por outros estudos. Outro ponto importante nesses trabalhos é a seleção dos participantes. A premissa fundamental se refere à definição do fenótipo em questão, ou seja, é essencial que todos os casos e nenhum controle tenham a doença estudada, por isso incluímos no grupo controle mulheres na pós-menopausa que não tiveram gravidez ectópica (Pearson, Manolio, 2008).

Muitos polimorfismos do gene do VEGF já foram descritos. Destes polimorfismos, alguns estão na região promotora localizada na posição -2578 C/A (rs 699947), -1154 G/A (rs1570360), -460 C/T (rs833061) e -634G/C (rs2010963) e os seus alelos mutantes estão associados com a maior expressão do VEGF. Além destes polimorfismos outro muito frequente é o +936C/T (rs3025039), tendo sido demonstrado que o alelo C está associado com o aumento dos níveis séricos de VEGF (Shahbazi et al., 2002 e Lambrechts et al., 2003).

A intenção de identificar predisposição genética para gravidez ectópica se deve ao fato de que muitas pacientes que desenvolvem a doença não apresentam nenhum fator de risco. Além disso, devido às recentes evidências de que o VEGF está aumentado na gravidez ectópica em comparação com a gestação intrauterina normal nos motivaram a levantar a hipótese de que alteração genética ligada ao polimorfismo do gene do VEGF poderia estar associada à gravidez ectópica.

No nosso estudo procuramos avaliar os três polimorfismos do VEGF mais comuns o +936 C/T, -460 C/T e o -634 G/C. A opção por estudar estas variantes polimórficas se deve a metodologia laboratorial bem estabelecida para avaliação

destes polimorfismos e por apresentarem correlação direta com a produção do VEGF. Agrupamos em nosso estudo número considerável de casos (74) e de controle (134). Por ser o primeiro trabalho sobre o tema não temos termo de comparação com outros estudos. Podemos nos basear apenas em trabalhos que avaliaram o polimorfismo do gene do VEGF com outras doenças, como retinopatia diabética (Awata et al., 2002), abortamento (Daher et al., 2003; Coulam et al., 2008), câncer (Krippel et al., 2003; Jin et al., 2005; Kim et al., 2005; Lu et al., 2005; Jacobs et al., 2006; Kataoka et al., 2006; Hefler et al., 2007; Chae et al., 2008; Langsenlehner et al., 2008) e endometriose (Shifren et al., 1996; Hsieh et al., 2004; Bhanoori et al., 2005).

O polimorfismo do gene do VEGF localizado na região promotora apresenta associação com o aumento da produção de VEGF sérico (Watson et al. 2000), nós prevíamos encontrar associação entre o genótipo e gravidez ectópica. Nossos resultados, entretanto, não conseguiram comprovar esta hipótese. Em nossa amostra não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e controle em relação ao polimorfismo do gene do VEGF -460 C/T ($p=0,70$), -634 G/C ($p=0,17$) e +936 C/T ($p=0,28$). Quando fizemos o estudo das frequências alélicas, os resultados foram similares com a população normal.

Podemos mencionar algumas dificuldades na realização de estudos como deste tipo. A determinação e divisão das raças é questão difícil. Já foi demonstrado que a população brasileira apresenta vários componentes raciais, principalmente em virtude da grande miscigenação resultante dos contextos políticos e sociais do nosso país (Pena et al., 2000; Santos, Maio, 2004). Sendo assim, a opção de escolher apenas uma raça certamente falsearia a representatividade dos grupos, além de ser sujeita a críticas quanto à pureza da classificação. Decidimos, portanto, não dividir os grupos quanto à etnia, mas tivemos o cuidado de parear as diferentes porcentagens raciais nos casos e controles, evitando diferenças significativas. Além disso, na procura de um marcador de doença, devemos considerar a população como um todo, de forma que o achado possa ser aplicado a qualquer indivíduo, independente da raça. Dessa forma, obtivemos dois grupos representativos da nossa população e comparáveis quanto à ausência ou presença da doença. Realizamos, ainda, o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos estudados. Em todos os grupos verificamos que as frequências genotípicas observadas estavam em equilíbrio com o esperado. Além

DISCUSSÃO

de sugerir que não houve viés na seleção de indivíduos, essa verificação assegura a qualidade das genotipagens. A análise dos estudos de associação genética pode ser feita de várias maneiras, considerando-se modelos genéticos dominantes, recessivos e co-dominantes. O modelo co-dominante, no qual cada genótipo é colocado como fator de risco para a doença, é o mais comum (Pearson, Manolio, 2008).

Neste trabalho procuramos também correlacionar os genótipos dos polimorfismos do gene de VEGF com os resultados do VEGF sérico coletado nas 35 pacientes na vigência da gravidez ectópica. A intenção de realizar esta correlação era de aventar que o genótipo do polimorfismo do gene do VEGF pode estar associado com as várias formas de apresentação da gravidez tubária. O estímulo da hipóxia na gravidez tubária com maior produção de VEGF e consequente maior angiogênese pode estar também relacionada aos casos de ruptura tubária. Quanto mais elevada a produção de VEGF, maior será a angiogênese e maior será o risco de ruptura tubária, pois haverá infiltração de vasos na parede da tuba atingindo a serosa e desta forma os vasos acarretarão uma corrosão na superfície da tuba culminando com o abdome agudo hemorrágico. Por outro lado, nem todos os casos de gravidez tubária evoluem para ruptura e muitas vezes é possível realizar o tratamento clínico. Partindo deste pressuposto levantamos a hipótese de que se o genótipo estivesse associado com a produção de VEGF sérico, poderíamos identificar as pacientes de maior risco para ruptura tubária e a aplicação prática seria muito útil.

O polimorfismo do gene do VEGF -634 G/C está localizado na região promotora e estudos anteriores demonstram a sua associação com a produção aumentada de VEGF (Watson et al. 2000; Cooke et al., 2004). Frente estas evidências, estudamos este polimorfismo no nosso grupo de estudo e observamos não haver diferença entre os casos e os controles.

Como Watson et al. demonstraram o genótipo -634 GG está correlacionado com maior produção de VEGF, em nosso estudo os casos de gravidez ectópica apresentaram mais este genótipo e talvez ele esteja associado ao maior risco de ruptura tubária pela maior produção de VEGF, já o genótipo CC parece produzir menor quantidade de VEGF pode estar associado aos casos de gravidez tubária íntegra com maior possibilidade de resolução com tratamento clínico. Este dado se comprovado seria útil no momento de instituir a conduta inicial nos casos de gravidez tubária. Em nossa amostra, no entanto, não pudemos comprovar este raciocínio, pois os resultados

DISCUSSÃO

não foram significantes. Apesar de que o genótipo 634 GG apresentava média dos valores de VEGF mais elevados (349,9 pg/ml), em comparação com genótipo 634 CC (VEGF médio de 248,0 pg/ml). Outro dado interessante desta pesquisa é que nos casos de gravidez ectópica foi mais frequente o genótipo do polimorfismo do VEGF 634 GG (47,3%) quando comparado com o controle (35,1%), apesar do resultado não ser estatisticamente significativo, existe uma tendência para este genótipo na gravidez ectópica.

Nem todos os trabalhos associam este genótipo 634 GG com a maior produção de VEGF. Awata et al. descreveram aumento do risco de retinopatia diabética em pacientes com genótipo 634 CC. Eles demonstraram aumento dos valores séricos de VEGF nas pacientes com genótipo CC na população japonesa. Talvez existam diferenças na frequência alélica conforme a etnia.

Em relação ao polimorfismo do gene -460 C/T não obtivemos resultados estatisticamente significantes. Os nossos resultados foram semelhantes aos observados por Watson et al. (2000) onde não observaram correlação do genótipo do polimorfismo do VEGF 460 com o aumento da produção de VEGF *in vitro*. Também não encontramos correlação entre o genótipo do polimorfismo do gene do VEGF -460 C/T com produção sérica de VEGF obtida das pacientes na vigência de gravidez ectópica ($p=0,3474$).

Em relação ao polimorfismo do VEGF +936 C/T, estudos anteriores demonstraram que os portadores do alelo 936 T apresentavam baixos níveis séricos de VEGF, enquanto outros estudos mostraram que portadoras do alelo C teriam aumento dos níveis de VEGF (Renner et al. 2000; Krippel et al., 2003). Em nosso estudo a porcentagem do alelo C foi de 87,2% e do alelo T 12,8%, porém não houve diferença estatística com o grupo controle alelo C (90,4%) e alelo T (9,6%). Apesar de o alelo C ser mais prevalente no grupo da ectópica em relação ao alelo T e desta forma estar mais associado a produção de VEGF, este padrão é semelhante no grupo controle. Quando comparamos o genótipo do polimorfismo do gene do VEGF +936 C/T com os valores séricos do VEGF não houve significância estatística ($p=0,2565$).

Este é um trabalho inédito uma vez que nenhum estudo foi publicado até o momento estudando a associação do polimorfismo do gene do VEGF com a gravidez ectópica. Apesar de muitos fatores de risco terem sido associados com o diagnóstico

DISCUSSÃO

da gravidez ectópica, não se sabe ainda ao certo se estão relacionados à etiologia. As teorias etiopatológicas para gravidez ectópica geralmente distinguem fatores de risco maternos e embrionários. Os maternos (gravidez ectópica prévia, infecção, cirurgia tubária, usuárias de DIU, tabagismo, infertilidade, endometriose, e fatores hormonais como pílula de progesterona e anticoncepção de emergência) afetam a função da tuba de Fallópio e o transporte do embrião para o útero. Os embrionários incluem anomalias estruturais e cromossômicas do conceito. É importante ressaltar que muitas pacientes com gravidez ectópica não apresentam nenhum fator de risco e o exame macroscópico da pelve é completamente normal. Por isso a investigação de causa genética é aspecto inédito na literatura e desta forma, continuando nesta linha de pesquisa e estudando outros polimorfismos do VEGF, que neste estudo não foram contemplados, ou mesmo, estudos que avaliam as interações dos genes poderão, talvez no futuro, preencher esta lacuna que até o momento não está bem esclarecida: O porquê da ocorrência de gravidez ectópica em grande número de pacientes sem nenhum fator de risco.

No entanto, não há, até o momento, evidências de associação entre polimorfismos de -460 C/T, -634C/G e +936C/T de VEGF e a gravidez ectópica. Porém, devemos ponderar que este é o primeiro trabalho sobre o tema, ressaltando que este estudo apresenta casuística robusta e é o único que investigou a relação entre esses polimorfismos e a gravidez ectópica na literatura mundial.

Assim, concluímos através de nossos dados que não verificamos associação entre os polimorfismos estudados: -460 C/T, -634C/G e +936C/T de VEGF e a ocorrência de gravidez ectópica. Em nossa óptica, é preciso ter cautela ao avaliar esses resultados, pois devemos considerar que há limitações relacionadas ao tamanho amostral, diversidade étnica e número de polimorfismos relacionados ao gene em questão.

Além da necessidade de ampliação do número de pacientes e de polimorfismos, é importante ponderar que a análise individual pode não revelar associações, mas os resultados podem ser diferentes quando se investiga a associação de diferentes genes (epistasia).

Além disso, as alterações genéticas podem não refletir exatamente o que acontece em nível periférico, na tuba uterina. Essa ressalva, entretanto, não diminui o interesse na investigação de polimorfismos genéticos e doenças. Mesmo sem repercussões fenotípicas, alterações genéticas podem ter valor preditivo como

marcadores de risco. Em estudos de associação genética, a necessidade de grandes amostras, o desconhecimento sobre a função do gene e possíveis vieses na seleção dos participantes são falhas comuns (Pearson, Manolio, 2008). Por isso, os dados precisam ser reproduzidos e confirmados. Mesmo assim, resultados negativos devem ser considerados. A reunião dos resultados publicados para a realização de metanálises pode ter valor considerável. Os estudos sobre o genoma têm ainda um passado recente e muito a se desenvolver ao longo dos anos. Collins e McKusick, em 2001 estimaram para 2010 a possibilidade de testes genéticos preditivos para pelo menos uma dezena de afecções comuns (Collins, McKusick, 2001). As consequências disso na prática médica certamente serão profundas, modificando totalmente os conceitos de diagnóstico e prevenção de doenças. Além disso, o DNA representa apenas uma pequena peça do incrível quebra-cabeça que é o corpo humano. À medida que aprendermos como as alterações genéticas, associadas a fatores individuais, participam na determinação da doença, intervenções efetivas estarão disponíveis. No caso das intercorrências obstétricas, a análise dos genótipos materno, paterno e fetal e suas interações, certamente poderão contribuir para o reconhecimento de fatores de risco.

É provável que as respostas ainda demorem um pouco a aparecer. No entanto, os esforços iniciais já foram lançados. As alterações genéticas abrem-se como um novo e deslumbrante campo para a busca da etiologia da gravidez ectópica. Futuros trabalhos, com análise de outros polimorfismos e fatores, serão necessários para esmiuçar essas inter-relações e tentar desvendar essa intrigante patologia que é a gravidez ectópica e, a partir daí, oferecer intervenções clínicas efetivas aos casais que vivem a angústia desta doença que é a principal causa de mortalidade materna no primeiro trimestre da gestação.

6 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Na gravidez ectópica os valores de VEGF são mais elevados do que na gravidez intra-uterina viável. Por outro lado, quando comparamos os valores de VEGF na gravidez ectópica com os casos de abortamento não encontramos diferença estatisticamente significativa.

Não foi observada associação entre as variantes polimórficas -460 T/C (rs833061), -634 C/G (rs2010963) e +936 C/T (rs3025039) do gene do fator de crescimento vaso-endothelial com a ocorrência de gravidez ectópica.

Não foi observada relação entre os níveis séricos de VEGF e os genótipos de polimorfismos -460 T/C (rs833061), -634 C/G (rs2010963) e +936 C/T (rs3025039) do gene de VEGF.

Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP:



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de dezembro de 2007.
CEP 1812/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARCELO OCTAVIO FERNANDES DA SILVA
Co-Investigadores: Julio Elito Jr (orientador), Silvia Daher
Disciplina/Departamento: Depto. De Obstetrícia - Disc. De Patologia Obstétrica da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Associação do polimorfismo do gene do fator vascular de crescimento endotelial com gravidez ectópica".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Avaliar se as variantes polimórficas do gene de VEGF podem ser associadas a ocorrência desta patologia..

RESUMO: Estudo prospectivo realizado no Departamento de Obstetrícia da UNIFESP, selecionando 120 pacientes com história de gravidez ectópica. O grupo controle será constituído por 120 mulheres na pós-menopausa que não tiveram gravidez ectópica e apresentaram pelo menos duas gravidezes normais sem intercorrências, que serão recrutadas no Ambulatório de Climatério. O polimorfismo genético será analisado no sangue periférico por técnica de PCR.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Diversos estudos têm demonstrado aumento dos níveis séricos do VEGF em pacientes com gravidez ectópica quando comparados com casos de gestação intra-uterina. Este estudo visa avaliar polimorfismos do gene VEGF em gravidez ectópica.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos e metodologia a ser empregada.

TCLE: Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 24788,00.

CRONOGRAMA: 18 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 6/12/2008 e 6/12/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Omar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CSP/1612/17

Anexo 2: Financiamento FAPESP:

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO	
TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO PROCESSO Nº 2005/59526-5	
O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:	
OUTORGADO JULIO ELITO JUNIOR CPF: 084.662.878-33	
INSTITUIÇÃO 05 075 001 - ESC PAULISTA MEDICINA/UNIFESP	
LINHA DE FOMENTO AUXILIO PESQUISA - REGULAR	
PROJETO FATOR VASCULAR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL COMO MARCADOR SOROLOGICO PARA O DIAGNOSTICO PRECOCE DA GRAVIDEZ ECTOPICA.	
ÁREA 04010000 - MEDICINA	PERÍODO 01/07/2006 a 31/12/2007
RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ: 30/06/2007, 20/12/2007	PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ: 30/06/2007, 28/02/2008
OBSERVAÇÕES - Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas. - Imediatamente após a apresentação do relatório científico estabelecido pela FAPESP como relatório final, o saldo acasado existente será automaticamente cancelado. - O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s). - A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega à FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituição na CNEN.	

Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido grupos Polimorfismo e

Polimorfismo controle:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1-ASSOCIAÇÃO DO FATOR VASCULAR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL E DO POLIMORFISMO DO SEU GENE COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA

2- O objetivo deste estudo é de avaliar se há diferença na expressão polimórfica do gene do VEGF em pacientes que apresentaram pelo menos um episódio de gravidez ectópica e pacientes com pelo menos duas gestações viáveis, sem história prévia de abortamento ou possibilidade de gravidez futura.

3- Será realizada coleta de sangue por punção venosa, no entanto, todas as pacientes invariavelmente terão que realizar este procedimento devido a coleta de sangue para realização do exame de beta-hCG.

4- O procedimento rotineiro será a coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, a quantidade de sangue retirada será de 5 ml.

5- Os desconfortos deste exame são dor leve no local da punção, os riscos são de formação de hematoma ou flebite no local da punção.

6- Não há benefício direto para o paciente. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de causa genética para gravidez ectópica. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

7- Como esta coleta de sangue terá que ser feita invariavelmente para extração de DNA, poucas opções são viáveis de forma alternativa.

8- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Julio Elito Junior, que pode ser encontrado no endereço Rua Botucatu, 740 8º andar, Telefone 5576-4110. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética Médica em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj. 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162, E-mail: cepunifesp@epm.br

9- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

10- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

11- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ASSOCIAÇÃO DO FATOR VASCULAR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL E DO POLIMORFISMO DO SEU GENE COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA”.

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

Data / /

Assinatura do paciente / Representante legal

Data / /

Assinatura testemunha

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

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

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido grupos VEGF e VEGF**controle:****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

1-ASSOCIAÇÃO DO FATOR VASCULAR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL E DO POLIMORFISMO DO SEU GENE COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA

2- O objetivo deste estudo é de avaliar um novo exame de sangue que visa realizar o diagnóstico precoce de gravidez ectópica e descartar o diagnóstico de gravidez normal ou abortamento.

3- Será realizada coleta de sangue por punção venosa, no entanto, todas as pacientes invariavelmente terão que realizar este procedimento devido a coleta de sangue para realização do exame de beta-hCG.

4- O procedimento rotineiro será a coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, a quantidade de sangue retirada será de 5 ml.

5- Os desconfortos deste exame são dor leve no local da punção, os riscos são de formação de hematoma ou flebite no local da punção.

6- Não há benefício direto para o paciente. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de um novo teste diagnóstico para gravidez ectópica. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

7- Como esta coleta de sangue terá que ser feita invariavelmente para o diagnóstico clássico de gravidez através do beta-hCG, poucas opções são viáveis de forma alternativa.

8- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Julio Elito Junior, que pode ser encontrado no endereço Rua Botucatu, 740 8º andar, Telefone 5576-4110. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética Médica em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj. 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162, E-mail: cepunifesp@epm.br

9- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

10- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

11- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO FATOR VASCULAR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL COM A GRAVIDEZ ECTÓPICA”.

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

Data / /

Assinatura do paciente / Representante legal

Data / /

Assinatura testemunha

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

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

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 5: Ficha de dados das pacientes:

Solicitação de Exames Coleta de Sangue

Nome Completo**Registro Hospitalar (RH)****Nº do documento de identidade (RG)****Data de nascimento****Telefone de Contato****Endereço****Diagnóstico****Tipo de Tratamento (Gestação Ectópica)****DUM****IG****ETNIA****Exame**☐ **VEGF**☐ **Polimorfismo****Data da Coleta****Coletor**

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13(5):572-6.

Ankum WM, Mol BW, Van der Veen F, Bossuyt PM. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 1996; 65(6):1093-9.

Ankum WM, Van der Veen F, Hamerlynk JVTH, Lammes FB. Transvaginal sonography and human chorionic gonadotrophin measurements in suspected ectopic pregnancy ; a detailed analysis of a diagnostic approach. *Hum Reprod*. 1993; 8(8): 1307-11.

Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(5):1635-9.

Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *Int J Cancer*. 2007; 121(5):1009-16.

Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay A, Vásárhelyi B, Szabó A, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(4):233-6.

Barnhart K, Mennuti MT, Benjamin I, Jacobson S, Goodman D, Coutifaris C. Prompt diagnosis of ectopic pregnancy in an emergency department setting, *Obstet Gynecol*. 1994; 84:1010-5.

Barnhart KT, Sammel MD, Rinaudo PF, Zhou L, Hummel AC, Guo W. Symptomatic patients with an early viable intrauterine pregnancy: hCG curves redefined. *Obstetric Gynecol*. 2004;104(1):50-5.

Baumwell S, Karumanchi SA. Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract*. 2007; 106(2):c72-81.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhanoori M, Arvind Babu K, Pavankumar Reddy NG, Lakshmi Rao K, Zondervan K, Deenadayal M, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G>C 5' untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in south Indian women: a case control study. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1844-9.
- Birkhahn RH, Gaeta TJ, Leo PJ, Bove JJ. The utility of maternal creatine kinase in the evaluation of ectopic pregnancy. *Am J Emerg Med*. 2000a;18: 695–7.
- Birkhahn RH, Gaeta TJ, Suzuki T, Katoh H, Nagai R, Bove J. Serum levels of smooth muscle heavy-chain myosin in patients with ectopic pregnancy. *Ann Emerg Med*. 2000b;36:101–7.
- Birkhahn RH, Gaeta TJ, Paraschiv D, Bove JJ, Suzuki T, Katoh H, Nagai R. Serum levels of myoglobin, creatine phosphokinase, and smooth muscle heavy-chain myosin in patients with ectopic pregnancy. *Ann Emerg Med*. 2001;38:628–32.
- Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*. 1999;60(12):1245-9.
- Brumsted JR, Nakajima ST, Badger G, Riddick GH, Gibson M. Serum concentration of CA-125 during the first trimester of normal and abnormal pregnancies. *J Reprod Med*. 1990;35:499–502.
- Buck RH, Joubert SM, Norman RJ. Serum progesterone in the diagnosis of ectopic pregnancy: a valuable diagnostic test? *Fertil Steril*. 1988;50:752–5.
- Buckley RG, King KJ, Disney JD, Riffenburgh RH, Gorman JD, Klausen JH. Serum progesterone testing to predict ectopic pregnancy in symptomatic first-trimester patients. *Ann Emerg Med*. 2000;36:95–100.
- Cacciatore B, Stenman UH, Ylostalo P. Diagnosis of ectopic pregnancy by vaginal ultrasound in combination with a discriminatory serum hCG level of 1000 mUI/ml. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990;97(10):904-8.

Cacciatore B, Stenman UH, Ylostalo P. Early screening for ectopic pregnancy in high-risk symptom-free women. *Lancet*. 1994;343:517–8.

Cartwright J, Duncan WC, Critchley HO, Horne AW. Serum biomarkers of tubal ectopic pregnancy: current candidates and future possibilities. *Reprod*. 2009 Jul;138(1):9-22. Epub 2009 Mar 25.

CDC. Ectopic pregnancy - United States, 1990 – 1992. *MMWR CDC Surveil summ*. 1995; 44(3):46-8.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435-9.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincent V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7(5):575-83.

Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Ahn BM, Moon JH, Jeon SW, Park JY, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. *J Korean Med Sci*. 2008 Jun;23(3):421-7.

Chandra L, Jain A. Maternal serum creatine kinase as a biochemical marker of tubal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 1995;49:21–3.

Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev*. 2003;66(1):24-31.

Chung K, Sammel MD, Chalian R, Coutifaris C, Feedman M, Barnhart KT. Defining the rise of serum HCG in viable pregnancies achieved through use of IVF, *Hum Reprod*. 2006;213:823-8.

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(5):1090-8.

Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA*. 2001;285(5):540-4

Condous G, Lu C, van Huffel SV, Timmerman D, Bourne T. Human chorionic gonadotrophin and progesterone levels in pregnancies of unknown location. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004;86:351–3.

Condous G, Okaro E, Khalid A, Lu C, Van Huffel S, Timmerman D, Bourne T. The accuracy of transvaginal ultrasonography for the diagnosis of ectopic pregnancy prior to surgery. *Hum Reprod*. 2005 May;20(5):1404-9.

Coulam CB, Jeyendram RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59(4):301-5.

Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, Gerbase-DeLima MG. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2003;58(1):69-77.

da Costa Soares R, Elito J Jr, Han KK, Camano L. Endometrial thickness as an orienting factor for the medical treatment of unruptured tubal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004;83(3):289-92.

da Costa Soares R, Junior JE, Camano L. Increment in beta-hCG in the 48-h period prior to treatment: a new variable predictive of therapeutic success in the treatment of ectopic pregnancy with methotrexate. *Arch Gynecol Obstet*. Epub 2008 Feb 15.

Daniel Y, Geva E, Lerner-Geva L, Esched-Englender T, Gamzu R, Lessing JB, et al. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with ectopic pregnancy: is this a novel marker? *Fertil Steril*. 1999;72(6):1013-7.

Daponte A, Pournaras S, Zintzaras E, Kallitsaris A, Lialios G, Maniatis AN, et al. The value of a single combined measurement of VEGF, glycodelin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Hum Reprod.* 2005;20(11):3163-6.

Daus K, Mundy D, Graves W, Slade BA. Ectopic pregnancy. What to do during the 20-day window. *J Reprod Med.* 1989; 34(2):162-6.

Daily CA, Laurent SL, Nunley WC Jr, The prognostic value of serum progesterone and quantitative beta-human chorionic gonadotropin in early human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 1994;171:380–3.

D'Antona D, Mamers PM, Lowe PJ, Balazs N, Groome NP, Wallace EM. Evaluation of serum inhibin A as a surveillance marker after conservative management of tubal pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13:2305–7.

Darai E, Vlastos G, Benifla JL, Sitbon D, Hassid J, Dehoux M, Madelenat P, Durand Gaucher G, Nunez E. Is maternal serum creatine kinase actually a marker for early diagnosis of ectopic pregnancy? *Eur J Obstet Gynecol.* 1996;68:25–7.

Develioglu OH, Askalli C, Uncu G, Samli B, Daragenli O. Evaluation of serum creatine kinase in ectopic pregnancy with reference to tubal status and histopathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 2002;109:121–8.

Duncan WC, Sweeting VM, Cawood P, Illingworth PJ. Measurement of creatine kinase activity and diagnosis of ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995;102:233–7.

Elito Júnior J, Uchiyama M, Camano L. Evolution of beta-hCG titers after systemic treatment of unruptured ectopic pregnancy. *Rev Assoc Med Bras.* 1998;44(1):11-5. Portuguese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Elito Jr J, Reichmann A, Uchiyama M, Camano L. Predictive score for the systemic treatment of unruptured ectopic pregnancy with a single dose of methotrexate. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999;67(2):75-9.

Elito J Jr, Han KK, Camano L. Tubal patency after clinical treatment of unruptured ectopic pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005a;88(3):309-13.

Elito J Jr, Han KK, Camano L. Values of beta-human chorionic gonadotropin as a risk factor for tubal obstruction after tubal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005b;84(9):864-7.

Elito Junior J, Han KK, Camano L. Tubal patency following surgical and clinical treatment of ectopic pregnancy. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(5):264-6.

Elito Junior J, Camano L. Unruptured tubal pregnancy: different treatments for early and late diagnosis. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(6):321-4.

Farah SB. DNA segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 1997.

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(2):309-13.

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

Ferrero S, Anserini P, Remorgida V, Ragni N. "Triple marker" for ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2004;82(4):986-7.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions, 2nd Edition; John Wiley & Sons, 1981;44-5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Florio P, Luisi S, D'Antona D, Severi FM, Rago G, Petraglia F. Maternal serum inhibin A levels may predict pregnancy outcome in women with threatened abortion. *Fertil Steril*. 2004;81:468-470.
- Florio P, Rossi M, Sigurdardottir M, Ciarmela P, Luisi S, Vigano P, Grasso D, Fiore G, Cobellis L, Di Blasio AM, Petraglia F. Paracrine regulation of endometrial function: interaction between progesterone and corticotropin-releasing factor (CRF) and activin A. *Steroids*. 2003;68:801-807.
- Florio P, Severi FM, Bocchi C, Luisi S, Mazzini M, Danero S, Torricelli M, Petraglia F. Single serum activin A testing to predict ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1748-53.
- Foth D, Romer T. Glycodelin serum levels in women with ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol*. 2003;108:199–202.
- Fritz M.A. and Guo S.M. Doubling time of human chorionic gonadotropin (hCG) in early normal pregnancy: relationship to hCG concentration and gestational age, *Fertil Steril*. 1987;47:584-9.
- Garcia A, Skurnick JH, Goldsmith LT, Emmi A, Weiss G. Human chorionic gonadotropin and relaxin concentrations in early ectopic and normal pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1990;75:779–83.
- Garcia-Velasco JA, Requena A, Santisteban J. Maternal serum creatine kinase: a possible predictor of tubal pregnancy? *Am J Obstet Gynaecol*. 1996;175:238–9.
- Gelder MS, Boots LR, Younger JB. Use of single random serum progesterone value as a diagnostic aid for ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1991;55:497–500.
- Gerton GL, Fan XJ, Chittams J, Sammel M, Hummel A, Strauss JF, et al. A serum proteomics approach to the diagnosis of ectopic pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:306-16.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*. 2006;203(9):2165-75.

Goldner TE, Lawson HW, Atrash HK. Surveillance for ectopic pregnancy United States, 1970-1989. *MMWR CDC Surveil summ*. 1993;42(6):73-85.

Gracia CR, Barnhart KT. Diagnosing ectopic pregnancy: decision analysis comparing six strategies, *Obstet Gynecol*. 2001;97:464-70.

Grosskinsky CM, Hage ML, Tyrey L, Christakos AC, Hughes CL. hCG, progesterone, alpha-fetoprotein, and estradiol in the identification of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1993;81:705-9.

Guillaume J, Benjamin F, Sicuranza BJ, Deutsch S, Seltzer VL, Tores W. Serum estradiol as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1990;76:1126-9.

Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Caminci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 1991;11(3):298-300,302.

Halila H, Stenman UH, Seppala M. Ovarian cancer antigen CA-125 in pelvic inflammatory disease and pregnancy. *Cancer*. 1986;57:1327-9.

Hayman R, Brockelsby J, Kenny L, Baker P. Pre-eclampsia: the endothelium, circulating factor (s) and vascular endothelial growth factor. *J Soc Gynecol Investig*. 1999;6(1):3-10.

Hefler LA, Mustea A, Könsgen D, Concin N, Tanner B, Strick R, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(3):898-901.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ho PC, Jones WR, Pregnancy-specific β 1-glycoprotein as a prognostic indicator in complications of early human pregnancy. *Am J Obstet Gynaecol.* 1980;138:253.

Horne CHW, Towler CM, Pugh-Humphreys RGP, Thomson AW, Bohn H. Pregnancy specific beta-1-glycoprotein – a product of the syncytiotrophoblast. *Experientia.* 1976;32:1197.

Horne AW, van den Driesche S, Critchley HOD, King AE, Burgess S, Myers M, Ludlow H, Williams AR, Duncan WC. Endometrial inhibin/activin beta-B subunit expression is related to decidualization and is reduced in tubal ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2375–82.

Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Yeh LS, Lin CC, Peng CT. T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'untranslated region: association with higher susceptibility to endometriosis. *J Reprod Med.* 2004;49(6):468-72.

Illingworth PJ, Groome NP, Duncan WC, Grant V, Tovanabutra S, Baird DT, McNeilly AS. Measurement of circulating inhibin forms during the establishment of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:1471-5.

Jacobs EJ, Feigelson HS, Bain EB, Brady KA, Rodriguez C, Stevens VL, et al. Polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the cancer prevention study II cohort. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):R22.

Jin Q, hemminki K, Enquist K, Lenner P, Grzybowska E, Klaes R, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3647-53.

Kadar N, De Vore G, Romero R. Discriminatory hCG zone: Its use in the sonographic evaluation for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1981;58(2):156-61.

Kaloglu C, Bulut HE. Vascular endothelial growth factor production by rat granulated metrial gland cells and their morphological features in normal and pathological conditions. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(2):341-50.

Kataoka N, Cai Q, Wen W, Shu XO, Jin F, Gao YT, et al. Population-based case-control study of VEGF gene polymorphisms and breast cancer risk among chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1148-52.

Katsikis I, Roussio D, Farmakiotis D, Kourtis A, Diamenti-Kandarakis E, Panidis D. Receiver operator characteristics and diagnostic value of progesterone and CA-125 in the prediction of ectopic and abortive intrauterine gestations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;125:226–32.

Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2904-8.

Kirk E, Papageorgiou AT, Van Calster B, Condous G, Bottomley C, Timmerman D, Spencer K, Bourne T. Can serial measurements of inhibin A and activin A be used to predict the outcome of pregnancies of unknown location? *Hum Reprod.* 2008;23(Supplement 1):i43(Abtract from the 24th Annual Meeting of ESHRE, Barcelona, Spain, 7–9 July 2008).

Korhonen J, Alfthan H, Stenman UH, Ylostalo P. Failure of creatine kinase to predict ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 1996;65:922–4.

Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2003;106(4):468-71.

Kucera-Sliutz E, Schiebel I, Konig F, Leodolter S, Sliutz G, Koelbl H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and discrimination between abnormal intrauterine and ectopic pregnancy. *Hum Reprod.* 2002;17(12):3231-4.

Kurzel RB, Mazdisnian F, Paige S, Liu P. Serum creatine kinase is not a reliable indicator of ectopic pregnancy. *Int J Fertil Womens Med.* 2001;46:300–3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kuscu E, Vicdan K, Turhan NO, Oguz S, Zorlu G, Gokmen O. The hormonal profile in ectopic pregnancies. *Mater Med Pol.* 1993;25:149–52.

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(2):1005-10.

Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Leung SW, Haines C. Increased messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the implantation site of the human oviduct with ectopic gestation. *Fertil Steril.* 2004;82(3):686-90.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund S. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34:383–394

Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, et al. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian “tumor of breast tissue: incidence, genetics and environmental risk factors” study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(2):297-304.

Lavie O, Beller U, Neuman M, Ben-Chetrit A, Gottcshalk-Sabag S, Diamant Y. Maternal serum creatine kinase: a possible predictor of tubal pregnancy. *Am J Obstet Gynaecol.* 1993;169:1149–50.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246(4935):1306-9.

Lincoln SR, Dockery JR, Long CA, RockWA Jr, Cowan BD. Maternal serum creatine kinase does not predict tubal pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13:702–4.

Lu H, Shu XO, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q, et al. Association of genetic polymorphisms in VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res.* 2005;65(12):5015-9.

Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol*. 2001; 145:225-236.

Mantzavinos T, Phocas I, Chrelias H, Sarandakou A, Zourlas PA. Serum levels of steroid and placental protein hormones in ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991;39:117–22.

Marill KA, Ingmire TE, Nelson BK. Utility of a single Beta HCG measurement to evaluate for absence of ectopic pregnancy. *J Emerg Med*. 1999;17:419–26.

Matthews CP, Coulson PB, Wild RA. Serum progesterone levels as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1986;68:390-4.

McCord ML, Muram D, Buster JE, Arheart KL, Stovall TG, Carson SA. Single serum progesterone as a screen for ectopic pregnancy: exchanging specificity and sensitivity to obtain optimal test performance. *Fertil Steril*. 1996;66:513–6.

Meunier K, Mignot TM, Maria B, Guichard A, Zorn JR, Cedard L. Predictive value of renin assay for the diagnosis of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 1991;55:432–5.

Mol BW, Hajenius PJ, Ankum WM, Bossuyt PM, van der Veen F. Screening for ectopic pregnancy in symptom-free women at increased risk. *Obstet Gynecol*. 1997;89:704–7.

Mol BW, Hajenius PJ, Engelsbel S, Ankum WM, van der Veer F, Hemrika DJ, Bossuyt PM. Serum human chorionic gonadotropin measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy when transvaginal sonography is inconclusive. *Fertil Steril*. 1998a;70:972-81.

Mol BW, Lijmer JG, Ankum WM, van der Veen F, Bossuyt PM. The accuracy of single serum progesterone measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Hum Reprod*. 1998b;13:3220–7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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(4):1106-11.
- Nederlof KP, Lawson HW, Saftlas AF, Atrash HK, Finch EI. Ectopic pregnancy surveillance, United States, 1970-1987. *MMWR CDC Surveil Summ*. 1990;39(4):9-17.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13(1):9-22.
- Nyberg DA, Mack LA, Laing FC, Jeffrey RB. Early pregnancy complications: endovaginal sonographic findings correlated with human chorionic gonadotropin levels. *Radiology*. 1988;167(3):619-22.
- O'Leary P, Nichols C, Feddema P, Lam T, Aitken M. Serum progesterone and human chorionic gonadotrophin measurements in the evaluation of ectopic pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1996;36:319-23.
- Paige S, Kurzel RB. Creatine kinase and ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynaecol*. 1995;172:1065-6.
- Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis M, Kontomanolis EN, Maltezos E. Association of -634G/C and 936C/T polymorphisms of the vascular endothelial growth factor with spontaneous preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004a;83(5):461-5.
- Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis M, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, Maltezos E. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2004b;10(5):321-4.
- Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2005;83(4):959-63.
- Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*.

2008;299(11):1335-44

Pedersen JF, Sorensen S & Ruge S 1991 Serum level of secretory endometrial protein PP-14 in intact ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995;98:414.

Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves Silva J, Prado VF, Santos FR. Retrato Molecular do Brasil. *Ciência Hoje.* 2000;159:16-25

Petraglia F, Sawchenko P, Lim AT, Rivier J, Vale W. Localization, secretion and action of inhibin in human placenta. *Science*, 1987;237:187-189.

Petraglia F, Vaughan J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:5114-5117.

Plewa MC, Ledrick D, Buderer NF, King RW. Serum creatine kinase is an unreliable predictor of ectopic pregnancy. *Acad Emerg Med.* 1998;5:300–3.

Qasim SM, Trias A, Sachdev R, Kemmann E. Evaluation of serum creatine kinase levels in ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 1996;65:443–5.

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.

Refaat B, Amer S, Ola B, Chapman N, Ledger W. The expression of activin- β A- and – β B-subunits, follistatin, and activin type II receptors in fallopian tubes bearing an ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):293-9.

Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000;37(6):443-8.

Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.* 1992;6(3):886-92.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Riss PA, Radivojevic K, Bieglmayer C. Serum progesterone and human chorionic gonadotropin in very early pregnancy: implications for clinical management. *Eur J Obstet Gynecol.* 1989;32:71–7.

Romero R, Kuivaniemi H, Tromp G, Olson J. The design, execution, and interpretation of genetic association studies to decipher complex diseases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002;187(5):1299-312

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a Ed. Rev e ampl. São Paulo; 2005.

Ruge S, Sorensen S, Vejtorp M, Vejerslev LO. The secretory endometrial protein, placental protein 14, in women with ectopic gestation. *Fertil Steril.* 1992;57:102–6.

Sadovsky Y, Pineda J, Collins JL. Serum CA-125 levels in women with ectopic and intrauterine gestations. *J Reprod Med.* 1991;36:875–8.

Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Cantini F, Salvi f, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism in Behçet's Disease. *J Rheumatol.* 2004;31(9):1785-9.

Santos RV, Maio MC. Qual "Retrato do Brasil"? Raça, Biologia, identidades e política na era da genômica. *Mana.* 2004;10(1):61-95

Schneider BP, Radovich M, Sledge GW, Robarge JD, Li L, Storniolo AM, et al. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Epub 2007 sep 20.

Seeber BE, Sammel MD, Guo W, Zhou L, Hummel A, Barnhart KT. Application of redefined human chorionic gonadotropin curves for the diagnosis of women at risk for ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 2006;86:454–9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Segal S, Gor H, Correa N, Mercado R, Veenstra K, Rivnay B. Inhibin A: marker for diagnosis of ectopic and early abnormal pregnancies. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:789–94.

Seifer DB, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Frishman GN, Schneyer AL. Serum inhibin levels are lower in ectopic than intrauterine spontaneously conceived pregnancies. *Fertil Steril*. 1996;65:667–9.

Seppala M, Purhonen M. The use of hCG and other pregnancy proteins in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 1987;30:148–54.

Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:260–264.

Shifren JL, Tseng JF, Zaludek 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(8):3112–8.

Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR, et al. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(3):271.e1–4.

Sjoberg J. Pregnancy associated plasma protein-A in pregnancy-related gynaecological emergency. *Hum Reprod*. 1987;2:615–6.

Smith KC, Bateman AC, Fussell HM, Howell WM. Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis. *Eur J Immunogenet*. 2004;31(4):167–73.

Soriano D, Hugol D, Quang NT, Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2003;79:975–80.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Soundravally R, Soundara Raghavan S, Selvaraj N. Serum creatine kinase as a predictor of tubal ectopic pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007;98;253–4.

Sowter MC, Farquhar CM. Ectopic pregnancy: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16(4):289-93.

Stabile I, Olajide F, Chard T, Grudzinkas JG. Circulating levels of placental protein 14 in ectopic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994;101:762–4.

Step toe PC, Edwards RG. Reimplantation of human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet*. 1976;1(7965):880-2.

Step toe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.

Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res*. 2003 Feb 15;63(4):812-6.

Stovall TG, Ling FW, Carson SA, Buster JE. Nonsurgical diagnosis and treatment of tubal pregnancy, *Fertil Steril*. 1990;54:537-8.

Tayade C, Fang Y, Croy BA. A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure. *J Reprod Dev*. 2007;53(3):455-63.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor of vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(3):1579-86.

The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Medical treatment of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2006;86(5):S96-102.

Timor-Tritsch I.E., Yeh M N., Peisner D.B., Lesser K.B. and Slavik T.A. The use of transvaginal ultrasonography in the diagnosis of ectopic pregnancy, *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:157-61.

Tornehave D, Chemnitz J, Westergaard JG, Teisner B, Poulsen HK, Bolton AE, Grudzinskas JG. Placental proteins in peripheral blood and tissues of ectopic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest.* 1987;23:97–102.

Torry DS, Holt VJ, Keena JA, Harris G, Caudle MR, Torry RJ. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril.* 1996;66(1):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(1):21-9.

Ugurlu EN, Ozaksit G, Karaer A, Zulfikaroglu E, Atalay A, Ugur M. The value of vascular endothelial growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, and progesterone for early differentiation of ectopic pregnancies, normal intrauterine pregnancies, and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril.* 2009 May;91(5):1657-61.

Vandermolen DT, Borzelleca JF. Serum creatine kinase does not predict ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 1996;65:916–21.

Von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expressions of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(7):627-34.

Vuorella P, Carpén O, Tulppala M, Halmesmäki E. VEGF, its receptors and tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(3):276-82.

Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 2000;12(8):1232-5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Wegner NT, Mershon JL. Evaluation of leukemia inhibitory factor as a marker of ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynaecol*. 2001;184:1074–6.

Witt BR, Wolf GC, Wainwright CJ, Johnston PD, Thorneycroft IH. Relaxin, CA125, progesterone, oestradiol, Schwangerschaft protein and human chorionic gonadotropin as predictors of outcome in threatened and non threatened pregnancies. *Fertil Steril*. 1990;53:1029–36.

Xie X, He H, Colonna M, Seya T, Takai T, Croy BH. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol Reprod*. 2005;73(3)510-8.

Yeko TR, Gorrill MJ, Hughes LH, Rodi IA, Buster JE, Sauer MV. Timely diagnosis of early ectopic pregnancy using a single blood progesterone measurement. *Fertil Steril*. 1987;48:1048–50.

Zane S, Kieke B, Kendrick J, Bruce C. Surveillance in a time of changing health care practices: estimating ectopic pregnancy incidence in the United States. *Matern Child Health J*. 2002;6:227-36.

ABSTRACT

Objectives: We evaluated the vascular endothelial growth factor (VEGF) as a serum marker on diagnosis of ectopic pregnancy. Besides, we intended to find out if the VEGF gene polymorphisms -460 T/C (rs 833061), -634 C/G (rs 2010963) and +936 C/T (rs 3025039) played a role in pathogenesis of this disease and furthermore if the serum levels of VEGF are correlated to genotype. **Methods:** A case-control study in which we selected 35 patients diagnosed with ectopic pregnancy, 15 with miscarriage, and 22 normal intra-uterine pregnancies. We collected 10 mL of blood in dry tubes, which were put into a centrifuge at 2000 rpm and then the upper part was separated into 5 tubes with 200 μ L each and kept at -80 ° C for posterior analysis. The serum VEGF was dosed with ELISA kit (human VEGF; R&D systems, Mineapolis). To study the VEGF gene polymorphisms we included 74 patients with present or previous history of ectopic pregnancy, who were followed up in The Ectopic Pregnancy Ambulatory of UNIFESP. In the control group there were 134 women in menopause, with at least two normal pregnancies and without miscarriages or ectopic pregnancies during their reproductive lives. These patients were followed up in The Menopause Ambulatory of UNIFESP. We collected 10 mL of blood, took buffy-coat and extracted DNA using DTAB / CTAB technique. Then we used PCR and a specific restriction enzyme to the VEGF gene polymorphisms 460 T/C, 634 C/G and 936 C/T, the samples were used to perform electrophoresis in agarose gel and posterior digital photographic registration. **Results:** The mean serum values of VEGF were 297.5 pg/mL in ectopic pregnancies, 299.6 pg/mL in miscarriages and 39.9 pg/mL in normal intra-uterine pregnancies ($p < 0.0001$). We found no significant differences on genotypic or allelic frequencies of the VEGF gene polymorphisms -460 T/C ($p = 0.70$), -634 C/G ($p = 0.17$) and +936 C/T ($p = 0.28$). There was no statistically significant correlation between genotype and serum values of VEGF. **Conclusions:** Our results suggest that in ectopic pregnancy the values of VEGF are higher than in normal intra-uterine pregnancy. However, we have found no association between the expression of the VEGF gene polymorphisms 460 T/C, 634 C/G and 936 C/T, and their alleles with ectopic pregnancy. The production of VEGF seems not to be related to the genotype.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes da Silva, Marcelo Octavio

Associação do fator de crescimento v sculo-endotelial e de polimorfismos do seu gene com a gravidez ectópica. /Marcelo Octavio Fernandes da Silva. – São Paulo, 2010.
xiv, 104f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Obstetrícia.

Título em inglês: Association study of vascular endothelial growth factor and polymorphisms of its gene with ectopic pregnancy.

1. gravidez ectópica. 2. Polimorfismo genético. 3. Fator de crescimento endotelial vascular. 4. SNPs.