

**LUCIANO GIBRAN**

**A expressão de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda para viabilização do uso de nanoemulsão lipídica carreadora de droga antiproliferativa**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

São Paulo  
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gibran, Luciano

A expressão de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda para viabilização do uso de nanoemulsão lipídica carreadora de droga anti-proliferativa / Luciano Gibran. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Ginecologia e Obstetria.

Orientador: Sergio Podgaec.

Descritores: 1.Endometriose 2.Receptores de LDL 3.Proteína-1 relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade 4.LDL-colesterol 5.Emulsões 6.Nanopartículas

USP/FM/DBD-248/16

*À minha mãe Tecla Gibran,  
Que, com seu amor infinito e suas orações,  
me mantém vivo e forte para enfrentar os desafios de todos os dias.*

*Ao meu pai João Saad Gibran,  
exemplo de ética, fé e humanismo,  
que me inspira desde sempre e diariamente a vencer na vida.*

*À minha esposa Denise,  
pela compreensão, estímulo e amor incondicional.  
Pela certeza de que, sem você, nada haveria.*

*Aos meus filhos João e Bruno,  
presença divina, amizade sem fim,  
todo o meu amor.*

*Aos meus sogros*

*Roberto Martins Freire e Maria Cecília dos Santos Freire (in memoriam),  
que me acolheram como filho, concedendo toda a amizade e carinho possíveis.*

*Às minhas irmãs*

*Juciane Gibran Laino e Patrícia Gibran Lemos Nunes,  
eternas amigas e companheiras, em todos os momentos da minha existência.*

*Aos meus sobrinhos*

*Fernando Gibran Lemos Nunes e Vitor Gibran Lemos Nunes,  
Jovens médicos de “homens e de almas”, orgulho e admiração.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Sergio Podgaec, cientista e professor por excelência, pelo incentivo, confiança e contribuição inestimáveis. E pela amizade preciosa que semeamos ao longo do caminho.

Ao Professor Maurício Simões Abrão, pelo exemplo, acolhimento, apoio irrestrito e incentivo à minha carreira acadêmica.

Ao Professor Edmund Chada Baracat, pelo incentivo e confiança desde o início.

Ao Professor Raul Cavalcante Maranhão, por acreditar e orientar todas as fases desse projeto.

Ao Professor Luiz Henrique Gebrim e Doutor André Malavasi, diretores do Hospital Pérola Byington, pela confiança e pelo incentivo em todos os meus projetos.

Ao Doutores Marco Antonio Bassi, Flavia Fairbanks, Gil Kamergorodsky, Jorge Milhem Haddad e Armando Romeo, pela amizade fraterna e companheirismo em todos os momentos.

À Marta Privatto, pela amizade, pela contribuição técnica e incentivo constantes.

À Priscila O. Carvalho, pela amizade, pela paciência, pelo apoio e contribuição inestimável na execução técnica do estudo.

À Elaine R. Tavares e Débora Deus, pela contribuição na execução técnica do estudo.

Ao Doutor Eidi Kumagai, pela parceria e contribuição na análise histológica.

À Denise Frediani, pelos ensinamentos fundamentais para a compreensão científica.

Ao Sr. Rogério Prado, pela execução e pelos ensinamentos de análise estatística.

Aos Doutores Manoel Orlando Gonçalves e Leandro Accardo de Matos, pela amizade, companheirismo e diagnósticos precisos.

Aos Doutores Alysson Zanatta, Luiz Flavio Cordeiro Fernandes, Patrick Bellelis, Tatiana Mandarino, Luiz Carvalho, Mateus Rosin, Roberta Ávila e Andresa Paiva pela amizade e parceria de trabalho, sempre dispostos a colaborar.

Aos Doutores João Antonio Dias Jr., Nicolau D' Amico, Claudio Severino Junior, Rogério Gomes, Daniel Caraça, Ana Paula Klautal Leite, Luiz Fernando Henrique, Lidia Myung, Malu Marin e Maricí Rached, exemplos de ética e comprometimento, minha grande admiração.

A Sra. Valdenice Pereira Lopes, (Nice), personagem fundamental na organização de todo meu trabalho, minha eterna gratidão.

Aos colegas do Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do HCFMUSP e do Hospital Pérola Byington, pela ajuda constante, e por participarem do atendimento ambulatorial e dos procedimentos cirúrgicos essenciais para a coleta de dados deste estudo.

Às pacientes, colaboradoras fundamentais para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.



*“Todo o trabalho é vazio a não ser que haja amor”.*

**Kahlil Gibran**



*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.*

**Cora Coralina**

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## SUMÁRIO

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE GRÁFICOS

### RESUMO

### *ABSTRACT*

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
1.1 Endometriose .....	3
1.2 Lipoproteínas e apolipoproteínas .....	6
1.3 Receptores de LDL .....	8
1.4 Nanotecnologia em Medicina e o desenvolvimento das nanoemulsões lipídicas .....	10
1.5 Hipótese do estudo .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo principal.....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Tipo do estudo e cálculo da amostra.....	21
3.2 Local do estudo .....	21
3.3 Pacientes.....	22
3.4 Critérios de inclusão .....	22
3.5 Dinâmica do estudo.....	22
3.6 Procedimento cirúrgico e coleta das amostras .....	25
3.7 Lípidos plasmáticos .....	26
3.8 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) .....	26
3.9 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real .....	27
3.10 Determinação proteica por imunistoquímica .....	28
3.11 Análise estatística .....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Características físicas, fase do ciclo menstrual e quadro clínico.....	33
4.2 Perfil lipídico .....	34

4.3 Expressão gênica de LDL-R e LRP-1 por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) .....	35
4.4 Determinação proteica de LDL-R e LRP-1 por imunistoquímica .....	38
4.5 Correlação de receptores de LDL com o índice de massa corpórea (IMC), idade e fases do ciclo menstrual .....	41
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1 Expressão de RNAm dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) .....	50
5.2 Determinação proteica por imunistoquímica dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) .....	55
5.3 Correlação de receptores de LDL com o índice de massa corpórea (IMC) .....	57
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>65</b>
7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo com Endometriose).....	65
7.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo sem Endometriose).....	72
7.3 Anexo C – Tabela com os dados das pacientes e suas características físicas. ....	79
7.4 Anexo D – Tabela com o perfil lipídico das pacientes .....	80
7.5 Anexo E – Tabela com os dados de expressão gênica.....	81
7.6 Anexo F – Tabela com os dados de determinação proteica.....	82
7.7 Anexo G – Aprovação CAPPesq - HCFMUSP .....	83
<b>9 REFERENCIAS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Apo	Apolipoproteína
EVA	Escala Visual Analógica de Dor
CT	Colesterol total
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Ciclo de amplificação)
DAB	Diaminobenzidina
$\Delta$ Ct	Delta Ct
DDS	<i>Drug Delivery Systems</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HDL-C	HDL Colesterol
IMC	Índice de massa corpórea
kDa	KiloDaltons
LCAT	Lecitina Colesterol Acetil Transferase
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LDL-C	LDL Colesterol
LDL-R	Receptor de LDL
LDE	Nanoemulsão lipídica
LPL	Lipase lipoproteica
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL
MMPs	Matriz Metaloproteinases
Milli-Q	Água deionizada e purificada.
nm	Nanômetro
PBS	Sais fosfato
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotações por Minuto

SR-B1	Scavenger Receptor Class B-1
STAR	Proteína Ativa Reguladora de Esteroidogênese
TG	Triglicérides
TE-4	Solução de Tris-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de densidade muito baixa)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Caracterização das Apolipoproteínas Humanas (adaptação de Mahley <i>et al.</i> , 1984).....	8
<b>Tabela 2</b>	Características físicas e fases do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose. ....	33
<b>Tabela 3</b>	Quadro clínico de mulheres com e sem endometriose. ....	34
<b>Tabela 4</b>	Determinação de lípidos plasmáticos em mulheres com e sem endometriose.....	35
<b>Tabela 5</b>	Comparações múltiplas sob os níveis de RNAm para os receptores LDL-R e LRP-1 entre grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose), ....	38
<b>Tabela 6</b>	Análise qualitativa da intensidade de marcação dos receptores LDL-R e LRP-1 por imunistoquímica nos grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose).....	40
<b>Tabela 7</b>	Comparações múltiplas sob o <i>score</i> de intensidade de marcação para LDL-R entre grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose). ....	41
<b>Tabela 8</b>	Análise de correlação entre idade e IMC com o <i>score</i> de intensidade de marcação e níveis de expressão de RNAm de LDL-R e de LRP-1 nos grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose).....	41
<b>Tabela 9</b>	Expressão gênica de LDL-R e LRP-1 em cada grupo com e sem endometriose nas fases do ciclo menstrual.....	42
<b>Tabela 10</b>	Análise qualitativa da intensidade de marcação para LDL-R e LRP-1 em cada grupo com e sem endometriose nas fases do ciclo menstrual. ....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da LDL ( <i>Low-Density Lipoprotein</i> ) (Extraído de <a href="http://www.healthprotocols.com">www.healthprotocols.com</a> ).....	11
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da LDL natural mostrando a semelhança da nanoemulsão lipídica LDE, exceto pela ausência da apolipoproteína B.....	13
<b>Figura 3</b>	Quadro explicativo da dinâmica do estudo.....	24
<b>Figura 4</b>	Lesão de endometriose intestinal após ressecção segmentar. ....	25
<b>Figura 5</b>	Fotomicrografias representativas de imunistoquímica para LDL-R e para LRP-1.....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Expressão gênica de LDL-R - Gráfico de barras mostrando o valor médio (erro padrão) dos níveis de RNAm para LDL-R em amostras de endométrio de mulheres sem endometriose (SEM EDT) e de mulheres com endometriose, sendo que uma amostra é proveniente do endométrio (endométrio COM EDT) e, a outra, da lesão de endometriose (Lesão EDT) da mesma paciente. O gráfico está representado em escala logarítmica na base 10.....36
- Gráfico 2** Expressão gênica de LRP-1 - Gráfico de barras mostrando o valor médio (erro padrão) dos níveis de RNAm para LRP-1 em amostras de endométrio de mulheres sem endometriose (SEM EDT) e de mulheres com endometriose, sendo que uma amostra é proveniente do endométrio (endométrio COM EDT) e, a outra, da lesão de endometriose (Lesão EDT) da mesma paciente. O gráfico está representado em escala logarítmica na base 10.....37

## RESUMO

Gibran L. *A expressão de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda para viabilização do uso de nanoemulsão lipídica carreadora de droga antiproliferativa* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

**Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão gênica e a determinação proteica de receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) na lesão de endometriose profunda e comparar com o endométrio de mulheres com e sem endometriose, assim como determinar o perfil lipídico de pacientes com e sem endometriose profunda. **Pacientes e métodos:** Realizamos estudo transversal, caso-controle, exploratório com 39 pacientes, sendo 20 pacientes com diagnóstico histológico de endometriose profunda com comprometimento intestinal e 19 pacientes sem endometriose submetidas à laqueadura tubária laparoscópica. Foram coletadas amostras de sangue periférico no dia do procedimento cirúrgico para análise do perfil lipídico por meio da determinação de Colesterol total, HDL, LDL, VLDL, Triglicérides, APO A I e APO B 100. Foram também coletadas amostras de tecido endometrial com cureta de Pipelle e lesão de endometriose como parte do tratamento cirúrgico laparoscópico. Todas as amostras foram enviadas para análise histológica e submetidas à pesquisa de expressão gênica por PCR Real Time e à determinação proteica por imunistoquímica dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1). A fase do ciclo menstrual foi determinada no momento do procedimento cirúrgico. **Resultados:** As pacientes com endometriose profunda apresentaram níveis séricos de LDL-c significativamente inferiores às pacientes sem a doença ( $119 \pm 23$  vs  $156 \pm 35$ ;  $p=0,001$ ). O mesmo não foi observado com o colesterol total ( $187 \pm 27$  vs  $194 \pm 37$ ;  $p=0,562$ ), HDL-c ( $42 \pm 9$  vs  $43 \pm 14$ ;  $p=0,792$ ), Triglicérides ( $130 \pm 40$  vs  $119 \pm 55$ ;  $p=0,486$ ), APO A I ( $128,1 \pm 33,3$  vs  $136,5 \pm 19,9$ ;  $p=0,373$ ) e APO B 100 ( $76 \pm 20,9$  vs  $91,7 \pm 30,8$ ;  $p=0,085$ ). A análise de expressão gênica por PCR Real Time dos receptores de LDL revelou que o LDL-R foi significativamente mais expresso na lesão de endometriose comparado ao endométrio da mesma paciente, mas não ao endométrio de mulheres sem endometriose ( $0,012 \pm 0,009$  vs  $0,019 \pm 0,01$  vs  $0,027 \pm 0,022$ ;  $p<0,001$ ) e o LRP-1 foi significativamente mais expresso na lesão de endometriose tanto quando comparado ao endométrio da mesma paciente, quanto quando comparado ao endométrio das pacientes sem a doença ( $0,089 \pm 0,076$  vs  $0,126 \pm 0,072$  vs  $0,307 \pm 0,207$ ;  $p<0,001$ ). A análise de determinação proteica por imunistoquímica dos mesmos receptores revelou que o endométrio de mulheres sem a doença apresentou score de intensidade de marcação de LDL-R significativamente maior que o endométrio e a lesão de mulheres com endometriose ( $15 \pm 78,9$  vs  $9 \pm 45$  vs  $2 \pm 10$ ;  $p=0,026$ ), porém a marcação para o receptor LRP-1 não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $9 \pm 47,4$  vs  $6 \pm 30$  vs  $0 \pm 0$ ;  $p=0,073$ ). O estudo também demonstrou que houve expressão significativamente maior de RNAm

do receptor LDL-R ( $p=0,001$ ) na fase secretora do ciclo menstrual e o mesmo pode ser observado com relação à expressão de RNAm do receptor LRP-1, que foi superexpresso ( $p=0,008$ ) no endométrio de mulheres sem a doença. **Conclusões:** De acordo com os resultados de nossa pesquisa, concluímos que há redução dos níveis séricos de LDL em pacientes com endometriose profunda. Além disso, observamos maior expressão gênica de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda, comparado ao endométrio, tanto de mulheres sem endometriose quanto de mulheres com endometriose, achado não similar ao observado com a determinação proteica. Houve maior expressão de receptores de LDL em endométrio na fase secretora do ciclo. Este estudo abre oportunidade para viabilização de nanoemulsões lipídicas para acoplamento e direcionamento de drogas antiproliferativas no tratamento da endometriose profunda.

**Descritores:** Endometriose; Receptores de LDL; Proteína-1 Relacionada a Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade; LDL-colesterol; Emulsões; Nanopartículas.

## ABSTRACT

Gibran L. *LDL receptor expression in the cell membrane of foci of deep endometriosis suggests the feasibility of using lipid nanoemulsions as anti-proliferative drug carriers* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the gene expression and protein determination of LDL receptor (LDL-R and LRP-1) in deep endometriosis lesions and compare with the endometrium of women with and without endometriosis, as well as to profile lipid patients with and without deep endometriosis. **Methods:** We conducted an transversal, exploratory, case-control study with 39 patients: 20 patients with a histological diagnosis of deep endometriosis with intestinal involvement and 19 women without endometriosis who underwent laparoscopic tubal ligation. Peripheral blood samples were collected on the day of surgery for analysis of lipid profile by determining total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, triglycerides, APO AI and APO B 100. Specimens of endometrial tissue were collected using a Pipelle curette and endometriosis lesion specimens were obtained during therapeutic laparoscopic surgery. All samples were sent for histological evaluation and gene expression analysis by Real Time PCR and protein determination by immunohistochemistry of the LDL receptor (LDL-R and LRP-1). The phase of the menstrual cycle was determined at the time of surgery. **Results:** Patients with severe endometriosis had serum LDL-C levels significantly lower than the patients without the disease ( $119 \pm 23$  vs  $156 \pm 35$ ;  $p = 0.001$ ). The same was not observed with total cholesterol ( $187 \pm 27$  vs  $194 \pm 37$ ,  $p = 0.562$ ), HDL-C ( $42 \pm 9$  vs  $43 \pm 14$ ,  $p = 0.792$ ), triglycerides ( $130 \pm 40$  vs  $119 \pm 55$ ;  $p = 0.486$ ), APO AI ( $128.1 \pm 33.3$  vs  $136.5 \pm 19.9$ ;  $p = 0.373$ ) and APO B 100 ( $76 \pm 20.9$  vs  $91.7 \pm 30.8$ ,  $p = 0.085$ ). The analysis of gene expression by Real Time PCR of LDL receptors revealed that there was significantly greater expression of LDL-R in endometriosis lesions as compared to the endometrium of the same patient, but not when compared to the endometrium of women without endometriosis ( $0.012 \pm 0.009$  vs  $0.019 \pm 0.01$  vs  $0.027 \pm 0.022$ ,  $p < 0.001$ ). LRP-1 was significantly expressed in endometriotic lesions both when compared to the endometrium of the same patient as compared to the endometrium of patients without the disease ( $0.089 \pm 0.076$  vs  $0.126 \pm 0.072$  vs  $0.307 \pm 0.207$ ,  $p < 0.001$ ). Protein determination by immunohistochemistry of the same receptors revealed that the endometrium of women without endometriosis had a significantly higher staining intensity score than the endometrium and the lesions of women with endometriosis ( $15 \pm 78.9$  vs  $9 \pm 2$  vs  $45 \pm 10$ ,  $p = 0.026$ ) but the measurement for the LRP-1 receptor showed no statistically significant difference ( $9 \pm 47.4$  vs  $6 \pm 30$  vs  $0 \pm 0$ ;  $p = 0.073$ ). The study also demonstrated that there was significantly higher mRNA expression of the LDL-R receptor ( $p = 0.001$ ) in the secretory phase of the menstrual cycle, and the same can be observed with respect to the mRNA expression of LRP-1 receptor, which was overexpressed ( $p = 0.008$ ) in the

endometrium of women without the disease. **Conclusion:** Based on the findings of our research, we concluded that there is a reduction of serum LDL levels in patients with deep endometriosis. Moreover, we observed higher gene expression of LDL receptors on the cell membrane of foci of deep endometriosis, compared to the endometrium, both in women without endometriosis and women with endometriosis, a finding unlike that observed with the protein determination. There was greater expression of LDL receptors in the endometrium during the secretory phase of the cycle. These findings suggest the feasibility of using lipid nanoemulsions for coupling and targeted delivery of antiproliferative drugs in the treatment of deep endometriosis.

**Descriptors:** Endometriosis; Receptors, LDL; Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1; Cholesterol, LDL; Emulsions; Nanoparticles.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Endometriose

A endometriose, definida como presença de glândula e/ou estroma endometrial fora da cavidade uterina, pode ser classificada em superficial ou profunda de acordo com sua capacidade de infiltração nos tecidos (Benagiano *et al.*, 2014). Conforme descrito por Cornillie *et al.* em 1990, as lesões com profundidade acima de 5 mm situadas em fundo de saco de Douglas, reflexão vésico-uterina, ligamentos pélvicos, vagina e/ou intestino, representam o tipo de doença em que as pacientes apresentaram mais queixas de dor, enquanto as lesões superficiais se relacionaram com maior frequência aos casos de infertilidade (Cornillie *et al.*, 1990).

Acomete cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva (Eskenazi *et al.*, 1997; Viganò *et al.*, 2004) e promove sintomatologia algica muitas vezes incapacitante comprometendo significativamente a qualidade de vida das portadoras (Bassi *et al.*, 2009; Donnez & Squifflet, 2010). Estima-se que 5,3% a 12% das mulheres com endometriose apresentam a forma mais grave da doença com comprometimento profundo do intestino, o que pode ocasionar, quando indicado tratamento cirúrgico, riscos determinados de complicações intra e pós-operatórias, contribuir para eventual persistência dos focos, além das possibilidades de recorrência das lesões (Coronado *et al.*, 1990; Jerby *et al.*, 1999; Minelli *et al.*, 2009; Koninckx *et al.*, 2012).

O tratamento medicamentoso disponível, atualmente, visa atrofia dos focos de endometriose, seja por interrupção da atividade ovariana ao induzir status de hipoestrogenismo, seja por pseudodecidualização do endométrio e da lesão de endometriose, deste modo, podendo amenizar significativamente os sintomas (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2014). Por ser doença crônica e requerer tratamento de longa duração, algumas opções da terapêutica clínica atual enfrentam limitações pelo alto potencial de efeitos colaterais, como sintomas climatéricos e diminuição da

densidade mineral óssea, além de não proporcionar o desaparecimento definitivo dos focos (Fernandez *et al.*, 2004; Mettler *et al.*, 2014).

Embora seja considerada doença benigna, a endometriose possui características típicas de doença neoplásica, como a capacidade de invasão no estroma adjacente e associação com lesões a distância (Abrão *et al.*, 2006). Como o câncer, a endometriose pode aderir em outros tecidos, invadi-los e deformá-los (Thomas e Campbell, 2000; Van Gorp *et al.*, 2004). Além disso, os conceitos etiopatogênicos incluem fatores de crescimento e citocinas associados com a regulação de multiplicação celular e angiogênese, com função semelhante na carcinogênese (Podgaec *et al.*, 2007; Pupo-Nogueira *et al.*, 2007). Podgaec *et al.* demonstraram que, na endometriose, doença de características inflamatórias, ocorre relativo aumento de citocinas representativas de padrão de resposta imune humoral (Podgaec *et al.*, 2007; Podgaec *et al.*, 2012). Pupo-Nogueira *et al.* observaram que o fator de crescimento endotelial vascular evolui com variações cíclicas no fluido peritoneal (Pupo-Nogueira *et al.*, 2007). Além disso, a distribuição e a densidade vascular estão significativamente mais altos em pacientes com endometriose profunda (Kuroda *et al.*, 2010).

Estas alterações imunológicas produzem um microambiente semelhante ao encontrado em tumores ovarianos. Células epiteliais do ovário com potencial maligno, diante dessas alterações moleculares e bioquímicas, aumentam a capacidade de proliferação celular, reduzem mecanismos apoptóticos e, conseqüentemente, a imunovigilância. Como resultado, as células malignas, que normalmente deveriam ser eliminadas pela resposta imunológica, são capazes de sobreviver, proliferar e desenvolver tumores invasivos (Vlahos *et al.*, 2010b).

A principal questão fisiopatológica da endometriose parece implicar em perda de controle sobre a proliferação celular, uma característica semelhante à encontrada no desenvolvimento de lesões malignas (Van Gorp *et al.*, 2004). Em 2013, Abdalla-Ribeiro *et al.* demonstraram que o fator antiapoptótico Bcl2 está superexpresso em lesões de endometriose profunda de retossigmoide e ligamentos uterossacros quando comparados ao endométrio tópico da mesma paciente, enquanto o fator pró-apoptótico Bax é nulo no reto e endométrio

tópico, e apresenta baixíssima expressão nos ligamentos uterossacros (Abdalla-Ribeiro *et al.*, 2013).

Há indícios de que o carcinoma endometriode e de células claras do ovário estejam associados à endometriose. Os riscos parecem ser mais elevados em doença de longa data, influenciados pela alta concentração de ferro livre, que induz a *stress* oxidativo persistente (Koshiyama *et al.*, 2014). No entanto, é importante reconhecer que estes tumores são raros. Kobayashi *et al.*, em estudo de coorte de 6.398 mulheres com endometrioma ovariano, em seguimento de 17 anos, demonstraram incidência de 0,7% (46 mulheres) com câncer de ovário (Kobayashi *et al.*, 2007).

Considerando a preocupação com a perda de controle de fatores associados ao crescimento celular (Van Gorp *et al.*, 2004), especula-se que a exposição excessiva a estrogênios poderia estar relacionada a este fenômeno, colocando, deste modo, mulheres inférteis em risco aumentado para neoplasias ginecológicas, e que ovulações incessantes desempenhem um papel significativo no desenvolvimento do câncer do ovário (Vlahos *et al.*, 2010a/b). De acordo com esta hipótese, cada ovulação cria uma ferida na superfície epitelial ovariana, que são submetidas a processo de reparação pelo aumento da proliferação celular, o que poderia aumentar a probabilidade de danos ao DNA e promover mutações cancerígenas (Kobayashi *et al.*, 2007).

O estrogênio endógeno representa importante fonte de estímulo ao desenvolvimento da endometriose. Além da produção deste hormônio pelos ovários, tanto pela circulação quanto pela ruptura folicular durante a ovulação, que promove liberação de estradiol sobre os focos de endometriose, há a conversão de androstenediona em estrona e estradiol, catalisados pela aromatase, no tecido adiposo e pele, atingindo os focos de endometriose por meio da corrente sanguínea. Outra fonte é o colesterol sérico, que pode ser convertido em estradiol na própria lesão de endometriose, pois expressa um conjunto completo de genes esteroidogênicos, incluindo o gene da aromatase, induzindo a conversão hormonal (Bulun *et al.*, 2005).

Há mais de cem anos, John Holden Webb investigou, pela primeira vez, a associação entre o metabolismo lipídico e progressão de tumores, e sugeriu que o câncer ocorria devido à cristalização do colesterol nas células (Webb *et*

*al.*, 1901). Desde aquela época, o envolvimento do metabolismo lipídico na tumorigênese foi exaustivamente investigado. O colesterol, como composição de membranas celulares, foi estabelecido como exigência metabólica essencial para o processo de divisão celular (Martinez-Botas *et al.*, 1999; Martinez-Botas *et al.*, 2001) e foi demonstrado que células em proliferação apresentam aumento da absorção de colesterol (Guo *et al.*, 2011; Sundelin *et al.*, 2012). Além disso, as células cancerosas se adaptam para manter níveis elevados de colesterol intracelular por meio de diferentes mecanismos que incluem a produção endógena acelerada de colesterol e ácidos graxos (Pitroda *et al.*, 2009), alterações do efluxo de colesterol intracelular como demonstrado por Lee *et al.* no câncer de próstata (Lee *et al.*, 2013), e pelo aumento da absorção de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por superexpressão de receptores de membrana (Rudling *et al.*, 1990).

Considerando a relação do colesterol com mecanismos celulares fundamentais na tumorigênese e, também, o seu papel como precursor de hormônios esteroides, admitimos a hipótese de seu envolvimento na etiopatogenia da endometriose profunda, principalmente no que diz respeito à participação na indução de proliferação de lesões, devido à endometriose profunda apresentar características fenotípicas semelhantes à neoplasia e por sua dependência ao estrogênio.

Para compreensão dos mecanismos de envolvimento do metabolismo do colesterol e sua associação com a endometriose profunda, é de fundamental importância o entendimento das lipoproteínas, apolipoproteínas e o papel dos receptores de lipoproteínas.

## **1.2 Lipoproteínas e apolipoproteínas**

As lipoproteínas funcionam como veículos para transportar lipídios no sangue na forma de complexos de lipídios solúveis e proteínas. Os lipídios incluem triglicérides, ésteres de colesterol, colesterol livre e fosfolipídios (Henry *et al.*, 2011). As diferentes classes de lipoproteínas executam funções distintas

no transporte de lipídios e as apolipoproteínas específicas na superfície determinam o destino das lipoproteínas.

De acordo com suas características físicas e composição química, são classificadas em quatro grandes grupos:

- quilomícrons, são as maiores partículas lipoproteicas e as menos densas;
- VLDL são lipoproteínas de muito baixa densidade, com maior proporção de proteína;
- LDL são lipoproteínas de baixa densidade, ricas em ésteres de colesterol;
- HDL são lipoproteínas de alta densidade, que são as menores e as mais densas (Henry *et al.*, 2011).

Os níveis de colesterol no sangue são controlados, principalmente, pelo receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), presente na superfície de todas as células do corpo, que faz a mediação da captação das lipoproteínas ricas em colesterol do sangue. Proteínas específicas na superfície de certas lipoproteínas (apolipoproteína B100 e apolipoproteína E) interagem com o receptor de LDL e facilitam a internalização da lipoproteína nas células (Vitols *et al.*, 1990).

Apolipoproteínas são proteínas que se ligam a lipídios para formar lipoproteínas e facilitar o seu transporte no sistema linfático e circulatório. Atuam como ligantes, interagindo com receptores e, portanto, tem a capacidade de regular o metabolismo de lipoproteínas por determinação de absorção pelos tecidos (Brown *et al.*, 1994).

As apolipoproteínas específicas na superfície das lipoproteínas determinam o seu destino (Johnson *et al.*, 1997; Franklin *et al.*, 2014). Para entender o metabolismo da lipoproteína e a correlação com doenças associadas às anormalidades lipídicas, é necessário considerar as funções individuais das apolipoproteínas na regulação do metabolismo lipídico.

Neste estudo, optamos por avaliar os níveis séricos de duas importantes apolipoproteínas: Apo AI, responsável pela ligação com os receptores de

lipoproteínas de alta densidade e Apo B100, responsável pela ligação com os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (Breslow *et al.*, 1994; Mahley *et al.*, 1995).

Algumas das propriedades das apolipoproteínas estão resumidas na Tabela 1 (adaptação de Mahley *et al.*, 1984).

**Tabela 1** - Caracterização das Apolipoproteínas Humanas (adaptação de Mahley *et al.*, 1984).

<b>Apolipoproteína</b>	<b>Principais locais de síntese</b>	<b>Funções Principais</b>
<b>A I</b>	Fígado, Intestino	Proteína estrutural da HDL. Ligação para o receptor de HDL.
<b>A II</b>	Fígado	Inibe a ligação da apo-E com os receptores
<b>A IV</b>	Intestino	Pode facilitar o efluxo de colesterol das células. Possível função no metabolismo dos triglicérides.
<b>B 100</b>	Fígado	Proteína estrutural de VLDL e LDL. Ligação para receptor de LDL.
<b>B 48</b>	Intestino	Proteína estrutural dos quilomícrons.
<b>C I</b>	Fígado	Ativador de LCAT, que esterifica o colesterol livre nas partículas do HDL. Modula a ligação de subprodutos aos receptores.
<b>C II</b>	Fígado	Cofator da LPL
<b>C III</b>	Fígado	Modula a ligação de subprodutos aos receptores.
<b>E</b>	Fígado, cérebro, pele, gônadas, baço	Ligação de LDL a receptores restantes. Redistribuição local de lipídio. Transporte de colesterol reverso (HDL com Apo E)
<b>Apo (a)</b>	Fígado	Modulador de fibrinólise
<b>D</b>	Fígado, Intestino	Ativador de LCAT

LCAT: lecitina colesterol acetiltransferase; LPL: lipase lipoproteica

### 1.3 Receptores de LDL

O receptor de LDL (LDL-R) foi, inicialmente, identificado em 1973 e seu gene foi caracterizado em 1985 no Laboratório de Goldstein e Brown. Duas proteínas na superfície da lipoproteína, apo-B 100 e apo-E, se ligam ao receptor de LDL, e, por isso, pode também ser chamado de receptor apo-B100

e apo-E (Goldstein *et al.*, 1995). O LDL-R é uma glicoproteína sintetizada no retículo endoplasmático e está expresso na superfície da maioria das células, especialmente no fígado. As células podem adquirir colesterol do plasma pela captação dessas lipoproteínas por meio de receptores de LDL (Brown e Goldstein, 1986).

Depois que a lipoproteína se une ao LDL-R, o complexo permanece em uma área especializada da membrana da célula chamada fossa revestida. O “revestimento” é composto por um complexo de proteínas chamado clatrina, que agrupa os receptores em uma região da membrana da célula que pode invaginar e formar uma vesícula intracelular para conter a lipoproteína. À medida que essas vesículas internalizadas, ou endossomos, se movem para o citoplasma, o ambiente interno vai progressivamente se tornando mais ácido, causando dissociação entre o receptor e a lipoproteína. As lipoproteínas são degradadas nos lisossomos e os receptores não utilizados se reciclam para a superfície da célula (Herz *et al.*, 1988).

O número de receptores de LDL na superfície da célula é fortemente regulado. Se o conteúdo de colesterol de uma célula estiver elevado, há uma diminuição do número de receptores sintetizados. Por outro lado, se uma célula exigir colesterol, a expressão dos receptores de LDL sobe e o número de receptores na superfície da célula aumenta. Este sistema mantém a concentração intracelular de colesterol relativamente constante e impede acúmulo excessivo e, possivelmente, tóxico (Goldstein *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997).

O receptor LRP (receptor de LDL relacionado à proteína) é um dos membros da família de receptores de LDL. É denominado LRP-1 devido à homologia estrutural da sequência de domínios rica em cisteína com a molécula do receptor de LDL (Moestrup *et al.*, 1992). É expresso, principalmente, no fígado, mas também está presente em outros tecidos humanos, como células musculares lisas, fibroblastos, neurônios e astrócitos, epitélio do trato gastrointestinal, células gonadais, placentárias e medula óssea (Strickland *et al.*, 1995).

O LRP-1 é um receptor endocítico de amplo espectro e tem a função de intermediar o catabolismo de múltiplos ligantes como lipoproteínas e proteinases, além de toxinas bacterianas e alguns tipos de vírus (Strickland *et al.*, 1995).

Ho e colaboradores associaram a leucemia com a hipocolesterolemia correlacionando com aumento da atividade de receptores para LDL, de três a cem vezes maior, em células leucêmicas do que em leucócitos normais (Ho *et al.*, 1978). Este foi o principal impulso para o estudo da LDL como complexo capaz de transportar drogas antineoplásicas participando da revolução do uso da nanotecnologia em diversos setores da Medicina. Esse estado de hipocolesterolemia sérica também foi demonstrado em outras neoplasias (Maranhão *et al.* 2002; Kok *et al.*, 2011; Simko *et al.*, 2014).

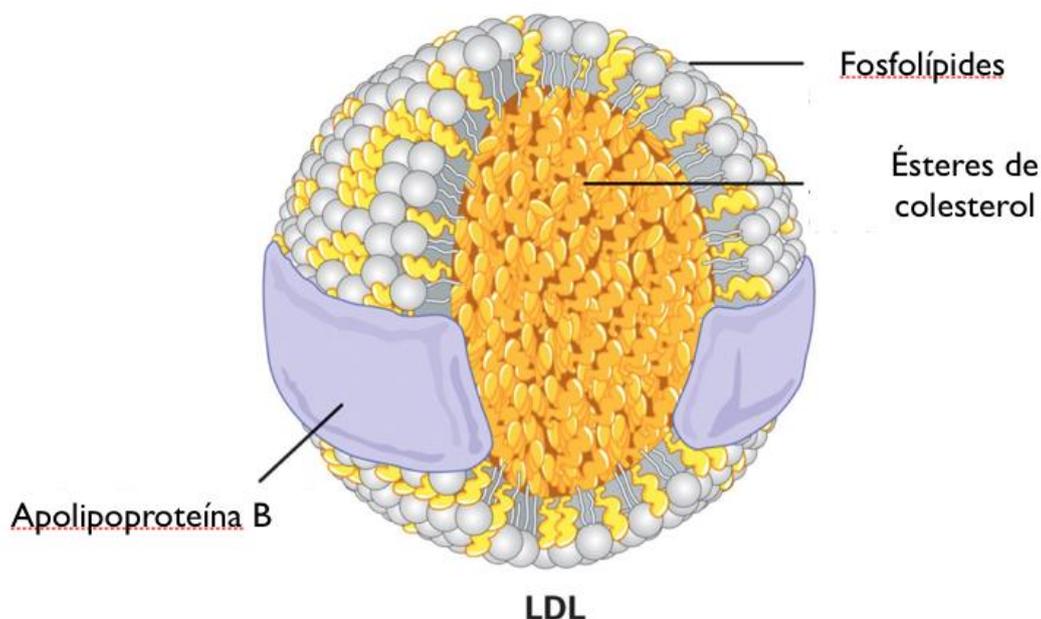
#### **1.4 Nanotecnologia em Medicina e o desenvolvimento das nanoemulsões lipídicas**

Partículas de dimensões variáveis, entre 1 e 100 nm, vêm sendo projetadas e progressivamente mais utilizadas para distribuição direcionada de drogas ou agentes de imagem diretamente no tecido-alvo na quantidade desejada (Medina *et al.*, 2007). Assim, este recurso tem sido empregado em diversas condições como câncer, diabetes, infecções fúngicas e virais, e terapia genética (Surendiran *et al.*, 2009). Além disso, limitam os efeitos colaterais e previnem o desenvolvimento de resistência farmacológica (Minko *et al.*, 2008).

A proposta original do uso da nanotecnologia aplicada à Medicina visa incorporar moléculas estranhas à LDL original. Esse processo envolve a substituição dos lípides internos do núcleo da LDL por outros compostos hidrofóbicos (Saad *et al.* 2008).

A LDL é uma grande partícula esférica (massa molecular  $3 \times 10^6$  kDa e 22 nm de diâmetro), que contém em seu núcleo cerca de 1.500 moléculas de ésteres de colesterol envoltas por uma proteína, a apolipoproteína B (apo-

B100), responsável pelo reconhecimento da estrutura pelo receptor de membrana específico (Vallabhajosula *et al.*, 1990).



**Figura 1** - Representação esquemática da LDL (*Low-Density Lipoprotein*) (Extraído de [www.healthprotocols.com](http://www.healthprotocols.com)).

O uso da LDL natural obtida do plasma, no entanto, mostrou-se muito dispendioso. O processo de isolamento a partir do sangue é trabalhoso e a obtenção de grandes quantidades, difícil. Isso fez com que fossem desenvolvidas emulsões lipídicas artificiais com comportamento metabólico similar à LDL e captação pelos mesmos receptores de membrana (Rudling *et al.*, 1990).

Um desdobramento importante nesta matéria teve lugar no Laboratório de Metabolismo e Lípidos do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo em artigos publicados a partir de 1992 (Maranhão *et al.*, 1992; 1993; 1994). Usando conhecimentos básicos do metabolismo das lipoproteínas e de tecnologia de manufatura de nanopartículas, o Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão e seu grupo conseguiram estruturar nanopartículas lipídicas capazes de concentrar-se em células neoplásicas, e, com isso, carrear quimioterápicos. Tratou-se de descoberta pioneira, já que foi a primeira vez que se demonstrou o direcionamento de partículas sólidas artificiais para o sítio de ação. A

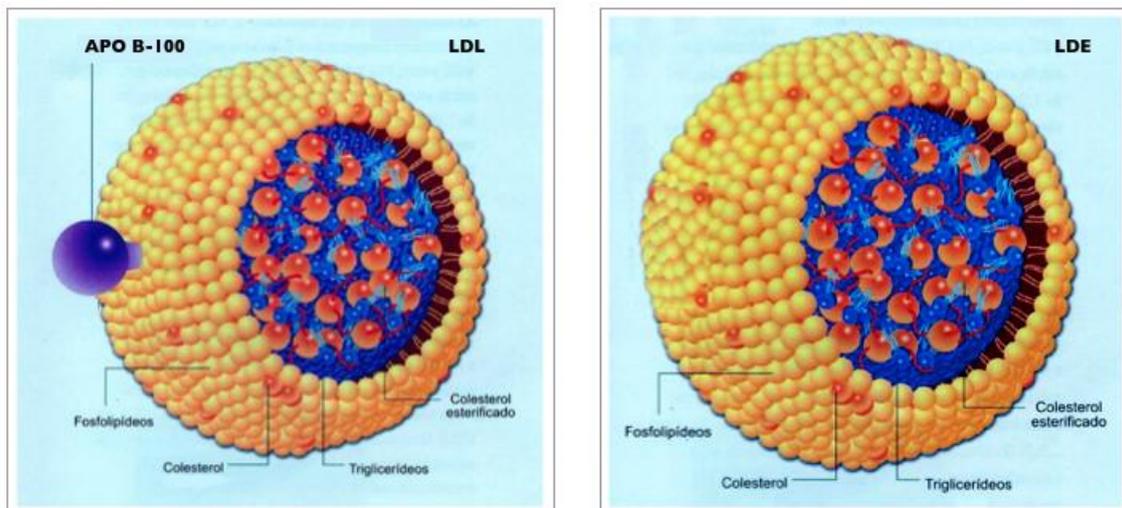
invenção foi objeto de patentes concedidas pelo Departamento de Comércio dos Estados Unidos da América (n° 08/388.147).

A emulsão lipídica denominada LDE assemelha-se, estruturalmente, com a porção lipídica da LDL original, porém não possui apolipoproteína B100. São produzidas por meio de tecnologia baseada em ultrassom, ultracentrifugação ou microfluidização sob alta pressão. Em contato com o plasma, LDE irá adquirir a apolipoproteína E, proteína presente na HDL, VLDL e quilomícrons, que, como outras apolipoproteínas, são móveis e migram das lipoproteínas originais para as partículas de LDE. Como a Apo E também pode ser reconhecida pelos receptores de LDL, permite que a LDE seja interiorizada pelas células pela mesma trajetória da LDL, por endocitose mediada pelos receptores de LDL (Ginsburg *et al.*, 1982, Wilson *et al.*, 1991, Maranhão *et al.*, 1993).

Desde então, o Laboratório de Metabolismo e Lípidos tem demonstrado a capacidade de acoplamento de diversos quimioterápicos à LDE: carmustina (Maranhão *et al.*, 2002), derivados de paclitaxel (Rodrigues *et al.*, 2002; 2005), etoposídeo (Valduga *et al.*, 2003), daunorrubicina (Teixeira *et al.*, 2008) e metotrexato (Moura *et al.*, 2011).

Em estudos *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003) e de farmacocinética em animais (Rodrigues *et al.*, 2005) e em pacientes (Maranhão *et al.*, 2002), foi demonstrado que as diversas preparações de LDE com quimioterápicos mantiveram-se estáveis, sendo que o fármaco transportado pelas nanopartículas não foi dissociado na circulação, permanecendo na LDE até a entrada nas células, condição indispensável para obtenção do efeito “*drug-targeting*”.

Estudos *in vivo* mostraram que o processo de veiculação reduziu significativamente a toxicidade dos quimioterápicos (Dorlhiac-Llacer *et al.*, 2001), na ordem de cinco a dez vezes (Valduga *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2002). Modelos experimentais oncológicos tratados com LDE-quimioterápico tiveram crescimento tumoral inibido, aumento do tempo de sobrevivência e redução acentuada de metástases (Lo Prete *et al.*, 2006; Kretzer *et al.*, 2012).



**Figura 2** - Representação esquemática da LDL natural mostrando a semelhança da nanoemulsão lipídica LDE, exceto pela ausência da apolipoproteína B.

Esta linha de pesquisa permitiu um avanço em direção a novas estratégias terapêuticas para artrite reumatoide (Mello *et al.*, 2013), leucemia mieloide aguda (Maranhão *et al.*, 1994; Dorlhiac-Llacer *et al.*, 2001), mieloma múltiplo (Hungria *et al.*, 2004), câncer de ovário (Ades *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2005), câncer de mama (Graziani *et al.*, 2002), linfoma Hodgkin e não Hodgkin (Pinheiro *et al.*, 2006), melanoma (Lo Prete *et al.*, 2006; Contente *et al.*, 2014), aterosclerose (Maranhão *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2013), doença vascular do enxerto do transplante cardíaco (Lourenço-Filho *et al.*, 2011) e, mais recentemente, o infarto agudo do miocárdio (Maranhão *et al.*, dados não publicados).

## 1.5 Hipótese do estudo

Considerando três pontos principais:

- a importância da linha de pesquisa que determina o papel do colesterol como substrato necessário para proliferação celular em casos de neoplasias malignas pela observação do aumento da expressão dos receptores de LDL em membrana de tumores

neoplásicos (Rudling *et al.*, 1990; Martinez-Botas *et al.*, 1999; Martinez-Botas *et al.*, 2001; Pitroda *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011; Sundelin *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013).

- os resultados encontrados em estudos que demonstram hipocolesterolemia em pacientes oncológicos, justificado pelo aumento do consumo de colesterol utilizado pela doença como combustível indutor de multiplicação celular (Ho *et al.*, 1978; Maranhão *et al.*, 2002; Kok *et al.*; Simko *et al.*, 2014).
- os conceitos etiopatogênicos na endometriose profunda que incluem fatores de crescimento e citocinas associados com a regulação de multiplicação celular e angiogênese, com função semelhante na carcinogênese (Abrão *et al.*, 2006; Pupo-Nogueira *et al.*; Podgaec *et al.*, 2007; Podgaec *et al.*, 2012; Abdalla-Ribeiro *et al.*, 2013).

A partir desses conceitos, a hipótese desse estudo é que as lesões de endometriose profunda possam apresentar o mesmo comportamento e as mesmas necessidades que outras lesões tumorais, ou seja, tenham alta avides pelo colesterol para composição de membrana celular, característica de lesões proliferativas. Para isso, devem superexpressar os receptores de colesterol, o que permitiria maior captação desse, resultando em menores concentrações séricas.

Assim, destacamos que os resultados esperados são a superexpressão, no tecido com endometriose, dos receptores de lipoproteínas LDL-R e LRP-1, quando comparado a tecido endometrial normal.

Posteriormente, pretendemos testar a capacidade da nanoemulsão lipídica, denominada LDE, de interiorização celular e, no futuro, poder selecionar uma droga para acoplamento nesta emulsão que seja capaz de suprimir o foco da doença.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Avaliar a expressão gênica e a determinação proteica de receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) na lesão de endometriose profunda.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Relacionar a expressão gênica e a determinação proteica dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) no endométrio das pacientes com endometriose profunda com o endométrio de mulheres sem a doença;
- Avaliar o perfil lipídico sérico de pacientes com e sem endometriose, por meio da dosagem de:
  - colesterol total;
  - LDL colesterol;
  - HDL colesterol;
  - triglicérides;
  - Apo A I;
  - Apo B 100.

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

---

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Tipo do estudo e cálculo da amostra**

Trata-se de estudo transversal, caso-controle, exploratório, com 39 pacientes, sendo 20 pacientes com diagnóstico histológico de endometriose profunda, todas com comprometimento intestinal, e 19 pacientes sem endometriose. Esse número de pacientes foi determinado pelo cálculo do tamanho da amostra.

Visando encontrar diferenças entre os grupos e locais de avaliação na determinação proteica por imunistoquímica e nas expressões do RNA mensageiro (RNAm), foram utilizados os 10 primeiros casos de cada grupo de mulheres como amostra-piloto e estabelecida a variabilidade da expressão dos níveis de RNAm, sendo essas medidas as únicas objetivamente avaliadas.

Supondo diferença média de, pelo menos, 1 desvio padrão entre as expressões na lesão endometriótica e no endométrio da paciente com endometriose ou da paciente sem endometriose, com poder de 80% e intervalo de confiança de 95%, a amostra necessária para a realização do estudo foi de 16 mulheres em cada grupo.

#### **3.2 Local do estudo**

O estudo foi realizado no Setor de Endometriose da Divisão da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas (HCFMUSP) e no Laboratório de Metabolismo e Lípidos do Instituto do Coração, ambos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Núcleo de Endoscopia Ginecológica e Endometriose do Hospital Pérola Byington.

### **3.3 Pacientes**

Todas as pacientes foram informadas previamente sobre os objetivos do estudo e as amostras foram coletadas somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As coletas das amostras cumpriram com a ética e os princípios práticos de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (# 0417/11) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Pérola Byington. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) contribuiu para a realização deste estudo com verba aprovada no Processo 2011/17245-0.

### **3.4 Critérios de inclusão**

Como critérios de inclusão, as pacientes de ambos os grupos estavam no menacme, apresentavam ciclos eumenorreicos, não eram portadoras de dislipidemia, doenças autoimunes, hormonais (SOP, tireoidopatias, outras) ou neoplasias malignas, e não utilizaram terapêutica antidislipidêmica ou hormonal nos três meses que antecederam a cirurgia. No caso de suspeita clínica de uma dessas condições, foram realizados exames laboratoriais e/ou de imagem para diagnóstico definitivo.

Para o grupo com endometriose, houve confirmação histológica das lesões. Para o grupo sem endometriose, houve avaliação pélvica por vídeolaparoscopia que confirmou a ausência de lesões.

### **3.5 Dinâmica do estudo**

Foram obtidos os dados clínicos das pacientes de ambos os grupos, incluindo os principais sintomas referidos por mulheres portadoras de endometriose, quais sejam: dismenorreia, dor pélvica acíclica, dispareunia de

profundidade, infertilidade, alterações urinárias cíclicas e alterações intestinais cíclicas. Considerou-se relevante a dismenorrea avaliada em escala visual analógica de dor, referida por nota igual ou acima de 7. Foram coletados também peso e altura das pacientes, para cálculo de índice de massa corpórea (IMC).

Para o grupo com endometriose, o protocolo do Setor de Endometriose do HCFMUSP foi seguido: pacientes com quadro de dor pélvica e suspeita de endometriose em retossigmoide por exame de imagem (ultrassom pélvico e transvaginal com preparo intestinal) usam terapêutica hormonal por 6 a 12 meses e são reavaliadas, nesse período, clinicamente e com novos exames de imagem. Na falha do tratamento, ou seja, diante da persistência de sintomas ou crescimento da lesão, há indicação de cirurgia. Em pacientes com quadro suboclusivo determinado por lesões intestinais profundas e extensas, a cirurgia é indicada de imediato. Este protocolo é seguido nas duas instituições participantes do estudo.

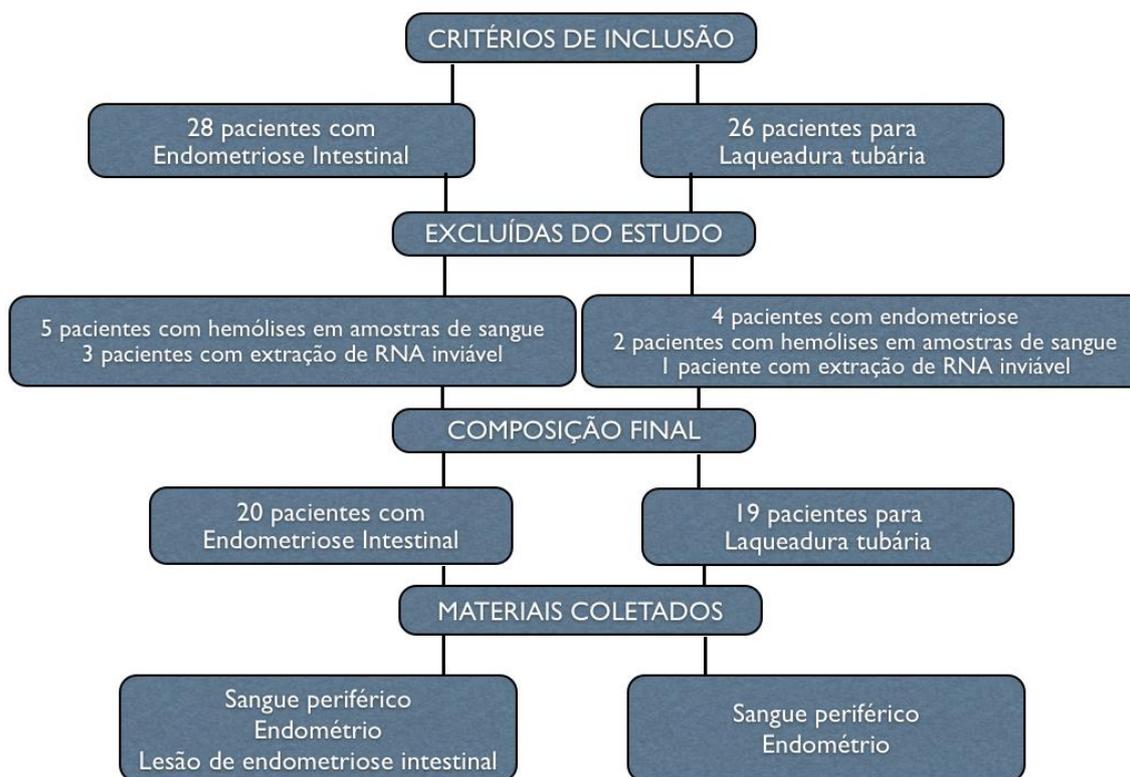
As pacientes do grupo sem endometriose foram compostas por mulheres com prole constituída e com desejo de anticoncepção definitiva consentido pelo parceiro, registrado em cartório, de acordo com a aprovação do Setor de Planejamento Familiar da Divisão de Clínica Ginecológica de ambas as instituições (HCFMUSP e Hospital Pérola Byington). O procedimento realizado foi a laqueadura tubária laparoscópica.

Foram realizados 54 videolaparoscopias consecutivas, sendo 28 para tratamento de endometriose profunda e 26 para laqueadura tubária.

Devido ao achado de endometriose peritoneal incidental em laparoscopias para laqueadura tubária, foram excluídas do estudo 4 pacientes do grupo sem endometriose.

Ainda, devido à necessidade de armazenamento do sangue periférico coletado no início de cada procedimento cirúrgico e posterior transporte dos tubos até o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ocorreu hemólise em 5 amostras de sangue das pacientes do grupo com endometriose e 2 amostras de pacientes do grupo sem endometriose, as quais foram retiradas do estudo. Foi verificado, no momento da extração do RNA e síntese de DNA

complementar, que quatro das amostras de RNA não estavam viáveis, e, por isso, foram excluídas do estudo, das quais três eram do grupo com endometriose e uma do grupo sem doença. Desta forma, o grupo com endometriose ficou composto por 20 pacientes e o grupo-controle (sem endometriose), por 19 mulheres.



**Figura 3** - Quadro explicativo da dinâmica do estudo.

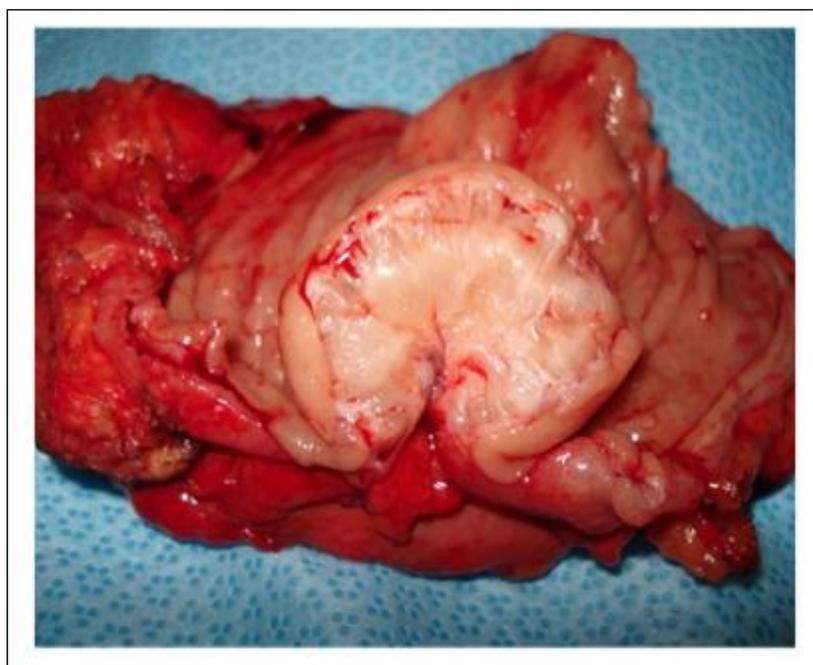
Foi registrado o dia do ciclo menstrual no momento da realização da cirurgia, sendo dividido em fase proliferativa quando a paciente estava entre o primeiro e o 14º dia do ciclo e secretora, do 14º ao último dia do ciclo menstrual (Ecochard & Gougeon, 2000). Esta divisão permitiu a análise de 11 pacientes (55%) na fase proliferativa e 9 (45%) na fase secretora no grupo com endometriose, e 10 mulheres (52,6%) na fase proliferativa e 9 (47,4%) na fase secretora, no grupo sem endometriose.

### 3.6 Procedimento cirúrgico e coleta das amostras

Antes do início do procedimento cirúrgico, foram colhidos 20 ml de sangue periférico de cada paciente, coletado de punção venosa em membro superior, após jejum de 12 horas.

As amostras de endométrio foram obtidas utilizando cureta de Pipelle<sup>®</sup> nos dois grupos, imediatamente após indução anestésica e posicionamento da paciente. Os focos de endometriose profunda foram totalmente ressecados como tempo obrigatório do tratamento cirúrgico proposto para erradicação da doença.

Os fragmentos de endométrio e das lesões de endometriose profunda intestinal, determinados por meio de análise macroscópica (Figura 4), foram divididos em duas partes, uma delas armazenada em paraformaldeído 4% e encaminhada ao Laboratório de Anatomia Patológica do HCFMUSP e do Hospital Pérola Byington (de acordo com o local da coleta) para análise histológica. A outra parte foi armazenada em solução de RNAlater<sup>®</sup> (Ambion Life Technologies, USA) e encaminhada ao laboratório de Metabolismo e Lípidos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



**Figura 4** - Lesão de endometriose intestinal após ressecção segmentar.

As amostras de sangue foram encaminhadas imediatamente após a coleta ao Laboratório de Metabolismo e Lípidos, em que foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos para separação do soro, que, assim como os tecidos em solução de RNA*later*<sup>®</sup>, foram armazenados a -80°C para análises posteriores.

### 3.7 Lípides plasmáticos

Para determinar o colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), foi utilizado método enzimático colorimétrico comercial (Labtest, Brasil). O HDL colesterol (HDL-C) foi medido pelo mesmo método utilizado para o CT, após precipitação com fosfotungstato e cloreto de magnésio. O LDL colesterol (LDL-C) foi calculado pela fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972), em que  $LDL = \text{Colesterol Total} - (VLDL + HDL)$  e VLDL, pela fórmula  $VLDL = TG/5$ . As concentrações séricas de apo A1 e apo B 100 foram determinadas por método imunoturbidimétrico (Roche, Alemanha).

### 3.8 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Após procedimento cirúrgico, o tecido coletado foi armazenado em solução de RNA*later*<sup>®</sup> (Ambion Life Technologies, EUA) e seu RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, EUA), segundo instruções do fabricante. A qualidade das amostras foi verificada por meio de corrida eletroforética em gel denaturante de agarose e as concentrações dessas foram determinadas por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280 nm no aparelho NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific, EUA), em que se consideraram satisfatórias razões que variavam de 1,8 a 2,0. Como já mencionado, quatro das amostras de RNA não estavam viáveis e por isso foram excluídas do estudo, das quais três eram do grupo com endometriose e

uma do grupo sem doença. As amostras-mãe foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

Para cada 16  $\mu\text{L}$  (250 ng) de RNA a ser reversamente transcrito, acrescentou-se 4  $\mu\text{L}$  do reagente *Superscript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> Master Mix 5X* (*Invitrogen Life Technologies*, EUA). Este produto foi incubado inicialmente por 10 minutos à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , por 60 minutos à temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$  e, por fim, por 5 minutos à temperatura de  $85^{\circ}\text{C}$ . Após esta etapa, as amostras foram diluídas 5 vezes em solução TE-4 e armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão gênica dos receptores LDL-R e LRP-1 foi analisada pela técnica de PCR em tempo real utilizando-se método de detecção Taqman com *primers* e sondas fluorescentes para a detecção do produto-alvo de PCR. Esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando padronização da reação.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems Life Technologies*, EUA) em um volume final de 12  $\mu\text{L}$ , constituídos de 1,2  $\mu\text{L}$  de cDNA (1:5), 4,2  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 6  $\mu\text{L}$  de *Taqman Universal PCR Master Mix*, 0,6  $\mu\text{L}$  de sonda Taqman 20x (*Taqman Gene Expression Assays*) específica de cada gene-alvo a ser analisado ou 0,6  $\mu\text{L}$  do reagente *Human GAPDH Pre-Developed TaqMan Assay 20X*, utilizado como gene normalizador (*housekeeping gene* ou *endogenous control gene*). Os ensaios *Taqman Gene Expression*, tanto para o LDL-R (Hs00181192\_m1) quanto para o LRP-1 (Hs00233856\_m1), bem como todos os reagentes utilizados para a reação foram adquiridos da *Applied Biosystems Life Technologies*, EUA).

O programa gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido automaticamente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do

ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*). Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o *software* deste equipamento.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e consideradas aceitáveis as reações cujo desvio padrão foi menor que 0,4 ou menor que um Ct de diferença.

A quantificação da expressão gênica foi realizada com o cálculo da expressão bruta ou Ct comparativo demonstrado pelo algoritmo  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). O valor de  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. A diferença dos valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) entre as amostras para cada gene (LDLR e LRP-1), após normalização pelo Ct do gene de expressão constante (GAPDH), reflete sua expressão diferencial. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída nos tecidos estudados.

Para este estudo, também foi calculada a expressão gênica relativa, utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que os Cts de GAPDH foram utilizados para normalização e o grupo-controle (endométrio de mulheres sem endometriose) foi utilizado como calibrador para cada receptor estudado.

### **3.10 Determinação proteica por imunistoquímica**

Os blocos de tecido de biópsia foram solicitados ao Departamento de Anatomia Patológica do HCFMUSP e do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington, em que foram realizadas as análises histológicas.

Foram solicitadas lâminas dos blocos de material parafinado correspondentes aos tecidos de endométrio (grupo sem endometriose) e foco de endometriose (grupo com endometriose) para o preparo das lâminas de imunistoquímica para análise dos receptores de LDL-R e LRP-1.

A desparafinização das lâminas foi feita com 3 banhos de xilol de 10 minutos cada, seguidos de 3 banhos de etanol absoluto, 2 banhos de etanol

95% e um banho de etanol 75%. As lâminas com os cortes histológicos foram, então, lavadas em água corrente.

Para realização da imunistoquímica, a recuperação de antígenos foi realizada por calor úmido e pressão em câmara de pressão para recuperação antigênica Pascal (Dako, EUA) com tampão citrato 10 mM pH 6,0 para ambos os antígenos, anti-LDL-R e anti-LRP-1.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 4 banhos de 5 minutos de peróxido de hidrogênio a 3%. O bloqueio de reações inespecíficas foi feito com soro fetal bovino diluído em solução salina tamponada com sais fosfato (PBS) durante 1 hora em estufa umidificada a 37°C. Os anticorpos primários anti-LRP-1 (Calbiochem, Alemanha) e anti-LDL-R (Abcam, EUA) previamente padronizados, foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina bovina. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 4°C. O sistema de detecção foi o polímero SuperPicture (Dako, EUA), aplicado por 25 minutos nos tecidos. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (Dako, EUA) e contracorado com hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram feitos em tecido de fígado humano sem o uso do anticorpo primário. Os controles positivos foram feitos em tecido de fígado humano seguindo todos os procedimentos descritos anteriormente.

A análise qualitativa da expressão proteica foi feita em microscópio óptico Nikon Eclipse i80, acoplado a *software* de análise de imagem *NIS-Elements AR 3.2 Imaging Software (Nikon Microscopy)*. A intensidade de cor do cromógeno DAB presente nos tecidos foi classificada de 1 a 4 (1:fraco, 2:médio, 3:forte, 4:muito forte) por 2 observadores independentes e cegos ao estudo.

### **3.11 Análise estatística**

As características físicas e perfil lipídico foram expressos em média e desvio padrão, comparados entre os grupos com e sem endometriose utilizando-se o Teste *t-Student*.

A fase do ciclo foi descrita com uso de frequências absolutas e relativas, e verificada associação entre os grupos com e sem endometriose, utilizando-se o teste qui-quadrado.

Foi verificada a existência de correlações da idade e do IMC com a expressão gênica e com determinação proteica dos receptores LDL-R e LRP-1, em cada grupo, com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose), por meio dos cálculos de correlação de Spearman.

A expressão gênica e determinação proteica dos receptores LDL-R e do LRP-1 para cada grupo com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose), foram comparadas entre as fases do ciclo menstrual, utilizando-se o teste Mann-Whitney, para verificar se há influência da fase do ciclo menstrual na expressão dos receptores.

O score de intensidade de marcação dos receptores LDL-R e LRP-1, avaliados por imunistoquímica, foram comparados entre os grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição marginal Poisson e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações permutável entre os locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) de uma mesma mulher.

A expressão gênica dos receptores LDL-R e LRP-1 foram comparadas entre os grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição marginal gama e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações permutável entre os locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) de uma mesma mulher.

Ambas as análises foram ajustadas pelo IMC e pela fase do ciclo menstrual.

Foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni para saber entre quais grupos (com e sem endometriose) ou locais de avaliação (endométrio ou lesão de endometriose) ocorreriam diferenças na expressão dos receptores LDL-R e LRP-1.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características físicas, fase do ciclo menstrual e quadro clínico

As mulheres selecionadas para o presente estudo, alocadas em dois grupos, o grupo com endometriose (20) e o grupo sem endometriose (19), foram pareadas por idade. Mulheres do grupo com endometriose apresentaram médias de peso ( $62,6 \pm 10,5$  vs.  $73,7 \pm 8,4$ ;  $p = 0,001$ ), altura ( $1,61 \pm 0,07$  vs.  $1,65 \pm 0,06$ ;  $p = 0,046$ ) e índice de massa corpórea (IMC) ( $24,1 \pm 3,2$  vs.  $26,9 \pm 2,9$ ;  $p = 0,006$ ) significativamente menores do que as mulheres do grupo sem endometriose, como pode ser observado na Tabela 2.

Além disso, as mulheres que compõem os grupos deste estudo, com e sem endometriose, foram separadas de acordo com a fase do ciclo menstrual em que se encontravam, fase proliferativa ou fase secretora. Do grupo com endometriose, 11 mulheres se encontravam na fase proliferativa e nove na fase secretora. Das mulheres sem endometriose, nove se encontravam na fase proliferativa e nove na fase secretora (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características físicas e fases do ciclo menstrual em mulheres com e sem endometriose.

	COM EDT (n = 20)	SEM EDT (n = 19)	<i>p</i>
<b>Características físicas</b>			
Idade (anos)	35,7 ± 6,3	33,6 ± 5,7	0,288
Peso (Kg)	62,6 ± 10,5	73,7 ± 8,4	<b>0,001</b>
Altura (m)	1,61 ± 0,07	1,65 ± 0,06	<b>0,046</b>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24,1 ± 3,2	26,9 ± 2,9	<b>0,006</b>
<b>Fase do ciclo menstrual n (%)</b>			0,882*
Proliferativa	11 (55)	10 (52,6)	
Secretora	9 (45)	9 (47,4)	

Dados expressos em média ± desvio padrão. EDT: endometriose. IMC: índice de massa corpórea. Teste *t-Student*, \* Teste qui-quadrado.

O quadro clínico das pacientes selecionadas para o estudo do grupo com endometriose evidencia sintomatologia algica exuberante, com prevalência de 55% de pacientes com dismenorreia severa (EVA  $\geq 7$ ), de acordo com a Escala Visual Analógica de Dor (EVA), que classifica de 0 a 10 os sintomas de acordo com a sua intensidade. Outros sintomas típicos da doença, como dor pélvica crônica (45%), dispareunia de profundidade (50%), alterações urinárias cíclicas (10%) e alterações intestinais cíclicas (40%) também foram observados neste grupo. A infertilidade esteve presente na maioria das pacientes selecionadas, com prevalência de 60%.

Não foram observados sintomas algicos relevantes no grupo sem endometriose.

Toda esta caracterização pode ser visualizada na Tabela 3.

**Tabela 3** - Quadro clínico de mulheres com e sem endometriose.

Sintomas	Com EDT (n=20)	Sem EDT (n=19)	P
Dismenorreia Severa (EVA $\geq 7$ )*	11 (55%)	1 (5,2%)	<b>0,001</b>
Dor Pélvica Crônica	9 (45%)	0 (0%)	<b>0,001</b>
Dispareunia de Profundidade	10 (50%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
Sintomas Urinários Cíclicos	2 (10%)	0 (0%)	0,487
Sintomas Intestinais Cíclicos	8 (40%)	0 (0%)	<b>0,003</b>
Infertilidade	12 (60%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>

\*EVA: Escala Visual Analógica de Dor; Teste qui-quadrado.

## 4.2 Perfil lipídico

A concentração de LDL-colesterol das mulheres do grupo com endometriose foi, em média, mais baixa quando comparado às mulheres sem a doença ( $119 \pm 23$  vs.  $156 \pm 35$ ;  $p = 0,001$ ), como pode ser observado na Tabela 4.

Na Tabela 4, pode-se notar que a concentração de apo B100 seguiu o mesmo padrão da concentração de LDL-colesterol: mulheres com endometriose apresentaram concentração de apo B100 menor que das

mulheres sem a doença ( $76 \pm 20,9$  vs.  $91,7 \pm 30,8$ ). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,085$ ).

Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas.

**Tabela 4** - Determinação de lípides plasmáticos em mulheres com e sem endometriose.

	COM EDT (n = 17)	SEM EDT (n = 19)	<i>p</i>
Colesterol (mg/dL)			
Total	187 ± 27	194 ± 37	0,562
HDL	42 ± 9	43 ± 14	0,792
LDL	119 ± 23	156 ± 35	<b>0,001</b>
Triglicerídeos (mg/dL)	130 ± 40	119 ± 55	0,486
Apolipoproteínas (mg/dL)			
AI	128,1 ± 33,3	136,5 ± 19,9	0,373
B100	76 ± 20,9	91,7 ± 30,8	0,085

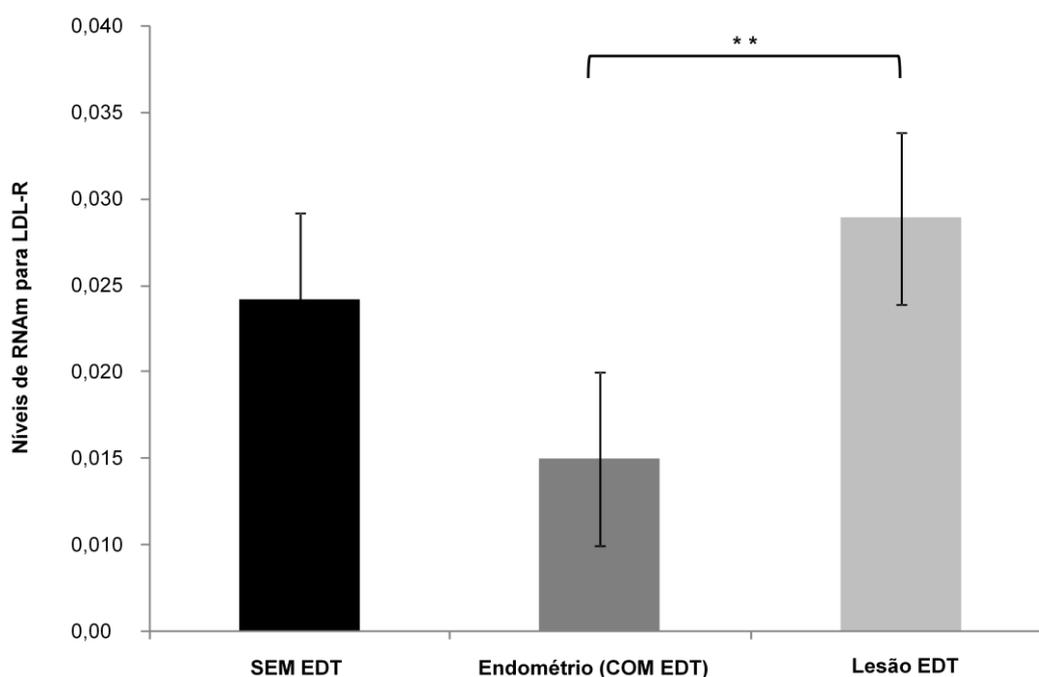
Dados expressos em média ± desvio padrão. EDT: endometriose. HDL: lipoproteína de alta densidade. LDL: lipoproteína de baixa densidade. Teste *t-Student*;

#### 4.3 Expressão gênica de LDL-R e LRP-1 por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

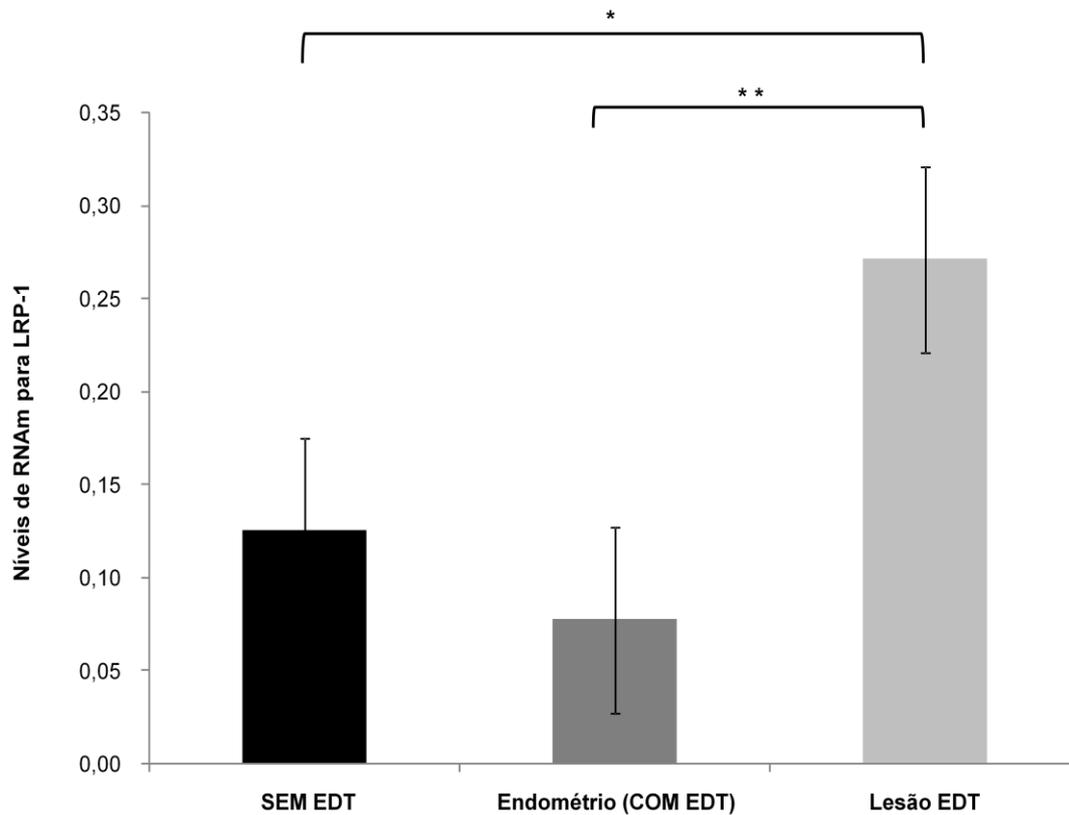
Na análise da expressão gênica dos receptores de LDL, determinada por qRT-PCR, foi comparado o endométrio típico (endométrio COM EDT) e foco de endometriose (Lesão EDT) de mulheres com endometriose com o endométrio típico de mulheres sem endometriose (SEM EDT). A expressão gênica foi calculada considerando-se o valor bruto, baseado no método  $2^{-\Delta Ct}$ . No Gráfico 1 e na Tabela 5, pode-se observar que a expressão gênica do LDL-R na lesão de endometriose aumentou cerca de 50% quando comparada com o endométrio da paciente com endometriose ( $p < 0,001$ ). Esse aumento esteve presente em 85% das mulheres com endometriose (17 casos de 20). Quando comparada a lesão de endometriose com o endométrio de mulheres sem endometriose, não houve diferença na expressão do receptor em questão.

A expressão gênica do LRP-1 na lesão de endometriose aumentou na ordem de 5x, quando comparada ao endométrio de mulheres com endometriose ( $p < 0,001$ ) e, na ordem de 2x, quando comparada ao endométrio de mulheres sem a doença ( $p = 0,004$ ), como pode ser observado no Gráfico 2 e Tabela 5. Esse aumento esteve presente em 95% das mulheres com endometriose (19 casos de 20). Quando comparada a lesão de endometriose com o endométrio de mulheres sem endometriose, 90% das pacientes apresentaram aumento na expressão gênica do LRP-1 (18 casos de 20).

**Gráfico 1** – Expressão gênica de LDL-R. - Gráfico de barras mostrando o valor médio (erro padrão) dos níveis de RNAm para LDL-R em amostras de endométrio de mulheres sem endometriose (SEM EDT) e de mulheres com endometriose, sendo que uma amostra é proveniente do endométrio (endométrio COM EDT) e, a outra, da lesão de endometriose (Lesão EDT) da mesma paciente. O gráfico está representado em escala logarítmica na base 10.



**Gráfico 2** – Expressão gênica de LRP-1 - Gráfico de barras mostrando o valor médio (erro padrão) dos níveis de RNAm para LRP-1 em amostras de endométrio de mulheres sem endometriose (SEM EDT) e de mulheres com endometriose, sendo que uma amostra é proveniente do endométrio (endométrio COM EDT) e, a outra, da lesão de endometriose (Lesão EDT) da mesma paciente. O gráfico está representado em escala logarítmica na base 10.



**Tabela 5** -Comparações múltiplas sob os níveis de RNAm para os receptores LDL-R e LRP-1 entre grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose),

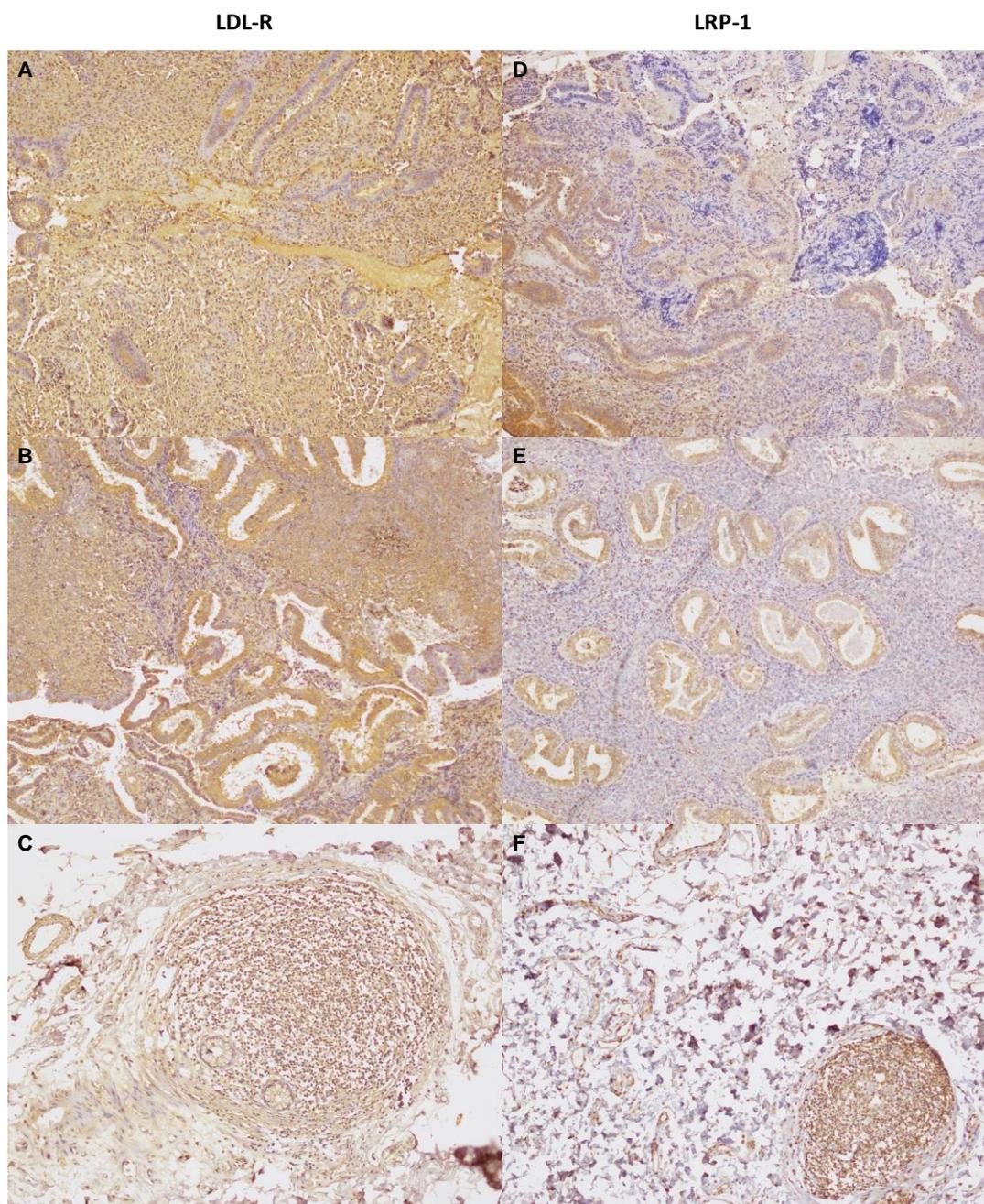
RNAm	Comparação	Diferença média	Erro padrão	<i>p</i>
<b>LDL-R</b>	Com EDT/Endométrio - Sem EDT/Endométrio	-0,0064	0,0032	0,130
	Com EDT/Endométrio - Com EDT/Lesão EDT	-0,0155	0,0039	<b>&lt;0,001</b>
	Sem EDT/Endométrio - Com EDT/Lesão EDT	-0,0092	0,0046	0,143
<b>LRP-1</b>	Com EDT/Endométrio - Sem EDT/Endométrio	-0,0418	0,0277	0,392
	Com EDT/Endométrio - Com EDT/Lesão EDT	-0,2208	0,0498	<b>&lt;0,001</b>
	Sem EDT/Endométrio - Com EDT/Lesão EDT	-0,1790	0,0555	<b>0,004</b>

Comparações múltiplas de Bonferroni (gl = 1). EDT: endometriose.

#### 4.4 Determinação proteica de LDL-R e LRP-1 por imunistoquímica

A determinação proteica de LDL-R e LRP-1 foi realizada por meio da técnica de imunistoquímica. A análise dos resultados foi realizada de maneira qualitativa de acordo com a intensidade de marcação avaliada por dois observadores independentes. A intensidade de marcação variou de 1 a 4, sendo: 1 = fraca; 2 = média; 3 = forte; e 4 = muito forte.

É possível visualizar essa variação de intensidade nas marcações das reações de imunistoquímica para os receptores analisados, LDL-R e LRP-1, na Figura 4.



**Figura 5** - Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para LDL-R e para LRP-1. **A e D**: endométrio de pacientes sem endometriose; **B e E**: endométrio de pacientes com endometriose; **C e F**: Lesão de endometriose. Aumento de 100X.

Como mostrado na Figura 5, pode-se observar que houve maior intensidade de marcação no endométrio, principalmente de mulheres sem endometriose, tanto para LDL-R quanto para LRP-1.

A Tabela 6 mostra este mesmo resultado de forma numérica por meio da leitura qualitativa (score variando de 1 a 4) para cada receptor analisado em

ambos os grupos estudados, com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose). Por esta análise, pôde-se observar que houve diferença entre os grupos, demonstrando maior intensidade de marcação para LDL-R ( $p = 0,026$ ) em endométrio de mulheres sem endometriose comparado ao endométrio de mulheres com a doença e à lesão de endometriose. No entanto, a intensidade de marcação para LRP-1 não apresentou diferença entre os grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) ( $p = 0,073$ ).

**Tabela 6** - Análise qualitativa da intensidade de marcação dos receptores LDL-R e LRP-1 por imunistoquímica nos grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose).

imunistoquímica	Grupo/Local			$p^*$
	Sem EDT/ Endométrio	Com EDT/ Endométrio	Com EDT/ Lesão EDT	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>LDL-R</b>				<b>0.026</b>
2	0 (0)	2 (10)	10 (50)	
3	4 (21,1)	9 (45)	8 (40)	
4	15 (78,9)	9 (45)	2 (10)	
<b>LRP-1</b>				0.073
1	0 (0)	1 (5)	4 (20)	
2	0 (0)	1 (5)	5 (25)	
3	10 (52,6)	12 (60)	11 (55)	
4	9 (47,4)	6 (30)	0 (0)	
<b>Total</b>	<b>19 (100)</b>	<b>20 (100)</b>	<b>20 (100)</b>	

Análise qualitativa, sendo: 1 = fraco; 2 = médio; 3 = forte; 4 = muito forte. \* Resultados ajustados pelo IMC e pela fase do ciclo menstrual. EDT: endometriose

Como foi observada diferença na intensidade de marcação para LDL-R, foi realizada uma análise de comparações múltiplas para este receptor comparando-se grupos (com e sem endometriose) e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose), conforme demonstrado na Tabela 7. É possível observar uma tendência de a intensidade de marcação para LDL-R ser maior no endométrio do que na lesão das mulheres com endometriose. Porém, não houve diferença estatística ( $p = 0,053$ ).

**Tabela 7** - Comparações múltiplas sob o *score* de intensidade de marcação para LDL-R entre grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose).

Comparação		Diferença média	Erro padrão	<i>p</i>
Com EDT/Endométrio -	Sem EDT/Endométrio	-0.30	0.66	>0,999
Com EDT/Endométrio -	Com EDT/Lesão EDT	0.75	0.32	0.053
Sem EDT/Endométrio -	Com EDT/Lesão EDT	1.05	0.63	0.290

Comparações múltiplas de Bonferroni (gl = 1). EDT: endometriose.

#### 4.5 Correlação de receptores de LDL com o índice de massa corpórea (IMC), idade e fases do ciclo menstrual

De acordo com análise comparativa realizada no presente estudo (Tabela 8), foi observado que o IMC apresentou correlação direta com a expressão gênica de LRP-1 (níveis de RNAm) na lesão de endometriose ( $r = 0,501$  e  $p = 0,024$ ) e com a intensidade de marcação para LDL-R (proteína) no endométrio de mulheres sem endometriose ( $r = 0,460$  e  $p = 0,048$ ).

**Tabela 8** – Análise de correlação entre idade e IMC com o *score* de intensidade de marcação e níveis de expressão de RNAm de LDL-R e de LRP-1 nos grupos com e sem endometriose, e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose).

Correlação	Sem EDT/Endométrio		Com EDT/Endométrio		Com EDT/Lesão EDT		
	Idade (anos)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Idade (anos)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Idade (anos)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	
<b>proteína</b>							
LDL-R	<i>r</i>	0.000	0.460	0.030	0.116	-0.062	0.275
	<i>p</i>	>0,999	<b>0.048</b>	0.900	0.628	0.795	0.241
LRP-1	<i>r</i>	-0.303	0.087	-0.357	-0.123	-0.258	-0.326
	<i>p</i>	0.207	0.724	0.122	0.604	0.273	0.160
<b>RNAm</b>							
LDL-R	<i>r</i>	-0.003	0.204	-0.070	-0.076	0.039	0.372
	<i>p</i>	0.991	0.401	0.769	0.750	0.870	0.107
LRP-1	<i>r</i>	0.098	0.107	-0.136	-0.284	0.078	0.501
	<i>p</i>	0.690	0.663	0.566	0.224	0.743	<b>0.024</b>

Correlação de Spearman. EDT: endometriose. IMC: índice de massa corpórea.

Com relação à divisão da fase do ciclo menstrual, proliferativa ou secretora, foi encontrado que os níveis de expressão de RNAm de LDL-R no endométrio de mulheres com endometriose foram maiores na fase secretora ( $p = 0,001$ ), assim como os níveis de expressão de RNAm do LRP-1 no endométrio de mulheres sem endometriose ( $p = 0,008$ ) também foram maiores na fase secretora, conforme pode ser visto na Tabela 9.

**Tabela 9** – Expressão gênica de LDL-R e LRP-1 em cada grupo com e sem endometriose nas fases do ciclo menstrual.

Grupo/Local	Expressão gênica	Fase do Ciclo		Total	<i>p</i>
		Proliferativa	Secretora		
<b>Com EDT/ Endométrio</b>	LDL-R	0,007 ± 0,003	0,017 ± 0,01	0,012 ± 0,009	<b>0,001</b>
	LRP-1	0,108 ± 0,097	0,067 ± 0,03	0,089 ± 0,076	0,710
<b>Sem EDT/ Endométrio</b>	LDL-R	0,015 ± 0,008	0,024 ± 0,011	0,019 ± 0,01	0,065
	LRP-1	0,093 ± 0,038	0,162 ± 0,085	0,126 ± 0,072	<b>0,008</b>
<b>Com EDT/ Lesão EDT</b>	LDL-R	0,025 ± 0,023	0,029 ± 0,02	0,027 ± 0,022	0,261
	LRP-1	0,291 ± 0,159	0,327 ± 0,264	0,307 ± 0,207	0,941

Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste Mann-Whitney. EDT: endometriose

A Tabela 10 mostra a correlação da fase do ciclo menstrual com a intensidade de marcação para LDL-R e LRP-1. Como pode ser observado, não houve diferença na intensidade de marcação para LDL-R e LRP-1 em cada grupo e local de avaliação, independentemente da fase do ciclo menstrual em que as mulheres se encontravam ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 10** – Análise qualitativa da intensidade de marcação para LDL-R e LRP-1 em cada grupo com e sem endometriose nas fases do ciclo menstrual.

Grupo/Local	Imunoistoquímica	Fase do Ciclo		Total n (%)	p
		Proliferativa n (%)	Secretora n (%)		
<b>Sem EDT/ Endométrio</b>	<b>LDL-R</b>				0.497
	3	3 (30)	1 (11,1)	4 (21,1)	
	4	7 (70)	8 (88,9)	15 (78,9)	
	<b>LRP-1</b>				0.182
	3	7 (70)	3 (33,3)	10 (52,6)	
	4	3 (30)	6 (66,7)	9 (47,4)	
	<b>Total</b>	<b>10 (100)</b>	<b>9 (100)</b>	<b>19 (100)</b>	
<b>Com EDT/ Endométrio</b>	<b>LDL-R</b>				0.941
	2	1 (9,1)	1 (11,1)	2 (10)	
	3	5 (45,5)	4 (44,4)	9 (45)	
	4	5 (45,5)	4 (44,4)	9 (45)	
	<b>LRP-1</b>				0.456
	1	0 (0)	1 (11,1)	1 (5)	
	2	1 (9,1)	0 (0)	1 (5)	
	3	8 (72,7)	4 (44,4)	12 (60)	
	4	2 (18,2)	4 (44,4)	6 (30)	
<b>Total</b>	<b>11 (100)</b>	<b>9 (100)</b>	<b>20 (100)</b>		
<b>Com EDT/ Lesão de endometriose</b>	<b>LDL-R</b>				0.766
	2	5 (45,5)	5 (55,6)	10 (50)	
	3	5 (45,5)	3 (33,3)	8 (40)	
	4	1 (9,1)	1 (11,1)	2 (10)	
	<b>LRP-1</b>				>0,999
	1	2 (18,2)	2 (22,2)	4 (20)	
	2	3 (27,3)	2 (22,2)	5 (25)	
	3	6 (54,5)	5 (55,6)	11 (55)	
<b>Total</b>	<b>11 (100)</b>	<b>9 (100)</b>	<b>20 (100)</b>		

Análise qualitativa, sendo: 1 = fraco; 2 = médio; 3 = forte; 4 = muito forte. EDT: endometriose.



## 5 DISCUSSÃO

Esse estudo representa a primeira fase de uma linha de pesquisa promissora para o tratamento da endometriose profunda e, de acordo com os resultados obtidos, poderá contribuir para a compreensão da progressão de lesões profundas; estas consideradas temidas por sua capacidade proliferativa, podendo tomar proporções tumorais expressivas.

Trata-se da investigação acerca da expressão de receptores de LDL em membrana celular de endometriose profunda, neste caso, realizado exclusivamente em lesões intestinais, com a finalidade de aventar a utilização de nanopartículas lipídicas para direcionamento de fármacos ao interior da lesão.

O desenvolvimento de nanopartículas com aplicações em *Drug Delivery Systems* (DDS) tem grande destaque nas pesquisas médicas da atualidade (Davis *et al.*; Zhang *et al.*, 2008). Partículas estáveis, não tóxicas e capazes de transportar os fármacos até seu local de ação, aumentando a seletividade e especificidade do tratamento, tem grande importância na otimização de terapias quimioterápicas (Contente *et al.*, 2014).

Os estudos que evidenciaram o papel do colesterol na oncogênese foram de extrema importância clínica, por demonstrarem que células tumorais apresentam maior captação de LDL quando comparados às células normais. (Nomura *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1994; Pandolfino *et al.*, 1997; Tomiki *et al.*, 2004).

Considerando a influência direta da dieta rica em gordura saturada sobre os níveis de colesterol séricos (Vartiainen *et al.*, 2016), avaliamos as características físicas das pacientes em nosso estudo e os resultados demonstraram média de idade semelhantes nos dois grupos, sem endometriose e com endometriose ( $33,6 \pm 5,7$  vs  $35 \pm 6,3$ ,  $p=0,288$ ), respectivamente.

Observamos que o grupo de mulheres sem endometriose, formado por múltiparas com desejo de submeterem-se à laqueadura tubária laparoscópica, apresentaram valores maiores de peso ( $73,7\pm 8,4$  vs  $62,6\pm 10,5$ ,  $p=0,001$ ), de altura ( $1,65\pm 0,06$  vs  $1,61\pm 0,07$ ,  $p=0,046$ ) e também de índice de massa corpórea ( $26,9\pm 2,9$  vs  $24,1\pm 3,2$ ,  $p=0,006$ ) comparado ao grupo de mulheres com endometriose.

Analisando os sintomas clínicos entre os dois grupos, observamos que houve alta prevalência de pacientes com infertilidade (60%), o que pode representar justificativa para a diferença observada em relação ao peso e IMC, uma vez que, segundo Paulino *et al.* (Paulino *et al.*, 2016), múltiparas são duas vezes mais propensas à obesidade comparado a nulíparas no início de uma gestação. O estudo observacional controlado, realizado com 130 primigestas e 160 múltiparas, evidenciou que 54,62% das primigestas iniciaram o pré-natal com índice de massa corpórea de normalidade enquanto que, no grupo das múltiparas, os índices compatíveis com obesidade foram registrados em 62,51% das mulheres (Paulino *et al.*, 2016).

Outra observação válida, ainda com relação à diferença do IMC entre os dois grupos, é que ambos estão distantes da classificação de obesidade que estipula valores de IMC entre 30 a  $39,9 \text{ kg/m}^2$  (Flegal *et al.*, 2013).

Desta feita, chamou-nos fortemente a atenção os resultados obtidos na avaliação do perfil lipídico, em que observamos que, de forma análoga aos resultados observados em alguns tumores, o grupo de pacientes com endometriose apresentou níveis inferiores estatisticamente significativos de LDL-c com relação ao grupo controle ( $119\pm 23$  vs  $156\pm 35 \text{ mg/dL}$ ,  $p=0,001$ ). Este resultado, pesquisado pela primeira vez em pacientes com endometriose profunda intestinal, sugere aumento do consumo de colesterol em mulheres com esta forma da doença.

Diante deste resultado, considerando as evidências da literatura, que demonstra a associação de hipocolesterolemia em pacientes com câncer em diversos órgãos distintos, inclusive o intestino grosso (Nomura *et al.*, 1991; Tomiki *et al.*, 2004) e, ainda, determina o estado de hipocolesterolemia como marcador de atividade proliferativa em leucemia aguda (Pandolfino *et al.*,

1997), consideramos haver a possibilidade deste tipo de associação em pacientes com endometriose profunda.

Analisando o quadro clínico do grupo de mulheres com endometriose, observamos tratarem-se de pacientes muito sintomáticas, das quais 55% apresentavam a queixa de dismenorreia severa, ou seja, com score da escala visual analógica de dor  $\geq 7$ , 45% evoluíam com dor pélvica crônica, 50% com dispareunia de profundidade e 40% relatavam dor às evacuações no período menstrual. Deste modo, podemos inferir que nosso grupo foi constituído por pacientes com a doença em franca atividade inflamatória, considerando as características e a intensidade da sintomatologia.

Não foram observadas diferenças entre os grupos, sem endometriose e com endometriose, nas concentrações de colesterol total ( $194 \pm 37$  vs  $187 \pm 27$  mg/dL;  $p=0,562$ ), HDL-c ( $43 \pm 14$  vs  $42 \pm 9$  mg/dL;  $p=0,792$ ), e triglicérides ( $119 \pm 55$  vs  $130 \pm 40$  mg/dL;  $p=0,486$ ). Em relação às apolipoproteínas, também não houve diferença na concentração de apo A1 ( $136,5 \pm 19,9$  vs  $128,1 \pm 33,3$  mg/dL) ou na concentração de Apo B100 ( $91,7 \pm 30,8$  vs  $76 \pm 20,9$  mg/dL;  $p=0,085$ ) entre os grupos.

Em estudo realizado por Melo *et al.* (Melo *et al.*, 2010), foi observada diferença significativa nos níveis de LDL-c no grupo de mulheres com endometriose quando comparado com o grupo de mulheres denominadas sem endometriose, demonstrando perfil lipídico desfavorável, com aumento de 38% nos níveis de LDL-c em pacientes com a doença. Porém, nesta pesquisa, as pacientes consideradas sem endometriose não tinham confirmação da inexistência da doença, apenas o fato de não apresentarem infertilidade ou dor pélvica. Há descrição na literatura de até 22% de achados incidentais de endometriose em pacientes assintomáticas submetidas à laqueadura tubária (Cramer; Murphy, 2002)

Além disso, não foi discriminado qual tipo de endometriose compunha o grupo de mulheres com a doença; se a forma superficial, ovariana ou profunda. Em nosso estudo, o objetivo foi avaliar exclusivamente a doença profunda em sua forma nodular, devido a sua semelhança com lesões expansivas tumorais, independente da presença de aderências ou outros achados como o endometrioma ovariano.

Com relação ao grupo controle de nosso estudo, todas as mulheres que apresentaram achados incidentais de endometriose peritoneal, superficial ou profunda, no momento da laqueadura, total de quatro pacientes, foram excluídas do estudo.

Apesar da atividade física e da perda de peso em indivíduos obesos ter sido associada com redução da pressão arterial, dos níveis séricos de triglicérides e LDL-c e aumento dos níveis séricos de HDL-c (Ades *et al.*, 2014), em recente estudo publicado por Franklin *et al.* (Franklin *et al.*, 2014), os autores afirmam a influência positiva da atividade física, superior à dieta de restrição, para redução de níveis de quilomícrons e VLDL-c, porém não observa benefícios da atividade física para redução dos níveis de LDL-c. Embora em nosso estudo não terem sido investigados quais pacientes praticavam atividade física, e, diante de todas as evidências apresentadas, consideramos de grande relevância o fato das pacientes com endometriose profunda terem apresentado níveis inferiores de LDL-c comparados ao grupo-controle.

Sugerimos que novos estudos, com metodologia semelhante com relação ao critério de seleção de pacientes e número maior de indivíduos, sejam realizados para observação desta associação.

### **5.1 Expressão de RNAm dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1)**

O objetivo principal desse estudo foi avaliar a expressão gênica e a determinação proteica dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1), com o intuito de compreender o comportamento celular da lesão profunda de endometriose com relação ao consumo de colesterol, ou seja, se haveria ou não uma avidéz por parte do nódulo deste metabólito.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que o nível médio de expressão do RNAm do LDL-R foi maior na lesão de endometriose que no endométrio de mulheres com EDT ( $p < 0,001$ ), já o nível médio de expressão do RNAm do LRP-1 foi maior na lesão de endometriose de mulheres com

EDT que no endométrio de mulheres com e sem EDT ( $p < 0,001$  e  $p = 0,004$ , respectivamente).

Conforme demonstraram Goldstein e Brown (Goldstein & Brown, 2009), se uma célula exigir colesterol haverá aumento da expressão de receptores de LDL em sua membrana enquanto, se o conteúdo de colesterol de uma célula estiver elevado, haverá uma diminuição do número de receptores sintetizados. Deste modo, admite-se que há um mecanismo regulatório de receptores de LDL na superfície da célula (Goldstein & Brown, 2009).

O colesterol é um componente essencial de membrana plasmática de células e também o precursor para a fabricação de todos os hormônios esteroides e ácidos biliares, além de desempenhar papel crucial na formação da bainha de mielina que rodeia axônios (Goldstein & Brown, 2009).

Dentro da célula, o colesterol derivado de LDL estabelece várias funções reguladoras, incluindo a inibição da síntese do colesterol por mecanismo de *feedback*. Além disso, os estudos do receptor de LDL deram origem ao conceito de endocitose mediada pelo receptor (Goldstein & Brown, 2009).

No contexto tumor, a expressão de LRP-1 deve responder positivamente à hipóxia (Montel *et al.*, 2007), porém os mecanismos regulatórios moleculares basais não foram bem caracterizados e compreendidos até agora (Emonard *et al.*, 2014).

Em tecidos normais, o LRP-1 é expresso por hepatócitos, macrófagos, fibroblastos, neurônios e células do músculo liso vascular, e há evidências que desempenha um papel importante na progressão do câncer (Moestrup *et al.*, 1992).

Diversos estudos demonstraram que o LRP-1 foi superexpresso em vários tipos de câncer, como o de mama (Catasus *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 1998), de endométrio (Catasus *et al.*, 2011b), de próstata (McGarvey *et al.*, 1996) e glioblastoma (Lopes *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1997; Gopal *et al.*, 2011). Além disso, Baum *et al.* relataram que a amplificação do gene de LRP-1 foi observada em alguns astrocitomas (Baum *et al.*, 1998).

Catasús *et al.* demonstraram também que a expressão de LRP-1 se associa aos carcinomas da mama triplo-negativo e HER-2/neu, mas não com o carcinoma dependente de hormônios, e que este receptor aumenta de

expressão de acordo com o grau de proliferação e invasão (Catasus *et al.*, 2011a).

Observou-se, portanto, que a expressão de LRP-1 em células tumorais parece altamente dependente do tecido, o subtipo do câncer e o grau (Emonard *et al.*, 2014).

De modo contraditório, outros estudos mostraram que a baixa expressão de LRP-1 pode estar associada a um fenótipo mais agressivo de vários tipos de tumor e que o nível diminuiu significativamente nos tipos invasivos em comparação com não invasivos em células de melanoma e próstata (Kancha *et al.*, 1994; de Vries *et al.*, 1996). Verificou-se, também, que um baixo nível de expressão LRP-1 foi associado com a agressividade e invasividade no carcinoma hepatocelular (Huang *et al.*, 2012), com evolução clínica desfavorável numa coorte de 439 pacientes com adenocarcinomas do pulmão (Meng *et al.*, 2011) e alta atividade de metástase em carcinoma folicular de tireoide (Sid *et al.*, 2006).

Consideramos, portanto, que a superexpressão de receptores de LDL em focos de endometriose profunda pode ter importante significado no que concerne a visão fisiopatológica do desenvolvimento e progressão deste tipo de doença. Além do colesterol atuar como substrato para divisão celular e componente de membrana, atua como precursor de hormônios esteroides, e esta função pode representar papel de grande importância no contexto do crescimento de lesões profundas.

Sabe-se que a atividade estrogênica desempenha papel etiopatogênico fundamental na endometriose contribuindo tanto na explicação de atividade de lesões quanto no mecanismo de dor (Brown e Farquar, 2014).

A proteína ativa reguladora de esteroidogênese (STAR) é responsável pelo passo inicial da formação de estrogênios, isto é, a entrada de colesterol na mitocôndria. Em seguida, cinco proteínas catalisam etapas enzimáticas para converter o colesterol em estradiol biologicamente ativo. A etapa principal, a conversão dos esteroides C19 em estrogênios, é catalisada pela aromatase, a qual sua inibição elimina de forma eficaz todo processo de produção de estrogênio (Bulun *et al.*, 2005).

A produção de estrogênio em mulheres com endometriose origina-se de três possibilidades distintas: o estradiol secretado pelo ovário, a conversão de androstenediona em estrona e, posteriormente, em estradiol, fenômeno catalisado pela aromatase no tecido adiposo e pele, e o colesterol, que é convertido em estradiol localmente no tecido com endometriose porque expressa um conjunto completo de genes esteroidogênicos, incluindo o gene da aromatase. A atividade da aromatase periférica ou local, ou ambos, pode ser particularmente importante na persistência da endometriose (Bulun *et al.*, 2005).

Existem claras diferenças moleculares entre o endométrio tópico e o tecido encontrado nos focos de endometriose, em que se observa o aumento da produção de estrogênio, prostaglandinas e citocinas, os quais determinam a inflamação presentes na endometriose. No endométrio tópico de mulheres sem endometriose, a atividade da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente, a produção de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) são baixas. O estrogênio não é produzido localmente, devido à ausência da enzima aromatase. No endométrio de mulheres com endometriose, observa-se aumento da atividade de COX-2 e atividade detectável de aromatase, levando à maior formação de PGE<sub>2</sub>, tanto no endométrio tópico quanto no foco de endometriose, causando cólicas menstruais severas e dor pélvica crônica (Bulun, 2009).

Em estudo que avaliou a expressão de SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B1*), que regula a entrada nas células de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), atuando como precursor de síntese de estrogênios, foi observado aumento da expressão tanto do gene quanto da proteína no endométrio e, mais intensamente, no tecido com endometriose. Deste modo, o autor propõe o uso de inibidores de SR-B1 associado a inibidores de aromatase como alternativa de tratamento clínico da endometriose (Ramachandran *et al.*, 2001).

Assim, entendemos que a superexpressão de receptores de LDL no foco de endometriose, com resultado significativamente superior ao encontrado no endométrio, tanto de mulheres com a doença quanto nas mulheres sem endometriose, representa importante achado no que concerne à

internalização do colesterol, permitindo o desencadeamento da produção autóctone do estrogênio e, conseqüentemente, influenciando no mecanismo de progressão e inflamação.

Do ponto de vista terapêutico, estes resultados são animadores no direcionamento a novas possibilidades como o uso das estatinas, inibidoras da 3 hidroxil 3 metilglutaril Coenzima A Redutase (HMG CoA), que visam reduzir os níveis séricos de colesterol. Estudos *in vitro* e *in vivo* iniciados em 2007 vêm demonstrando os benefícios das estatinas para o tratamento medicamentoso da endometriose por meio de sua ação antiproliferativa, anti-inflamatória, antioxidante, antiangiogênica e inibidora de matriz metaloproteinase (Gibran *et al.*, 2014).

Outra possibilidade promissora é o uso de nanoemulsão lipídica que permite o acoplamento de drogas antiproliferativas em seu interior e vem sendo utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias (Valduga, 2003; Azevedo, 2005; Mendes; Pires, 2009).

A nanoemulsão denominada LDE é rica em colesterol e absorvida pelos receptores de LDL (Maranhão *et al.*, 1992; Maranhão *et al.*, 1993; Maranhão *et al.*, 1994). É fabricada sem proteína, mas, em contato com o plasma, adquire apo E, que também é reconhecida pelos receptores de LDL permitindo a endocitose da nanoemulsão. Assim, pode ser utilizada para direcionar as drogas antineoplásicas contra células cancerosas que superexpressam o receptor de LDL (Ades *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que, após a injeção intravenosa em pacientes, a nanoemulsão (LDE) pode se concentrar em células de leucemia e em tumores sólidos, tais como carcinomas dos ovários e de mama que superexpressam esses receptores (Maranhão *et al.*, 1994; Ades *et al.*, 2001; Graziani *et al.*, 2002).

Recentemente, a associação de fármacos antineoplásicos com LDE, tais como carmustina e compostos derivatizados de etoposide e do paclitaxel, foram testados (Maranhão *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005). A derivatização com ácido oleico foi utilizada como uma estratégia para melhorar o rendimento da associação e a estabilidade do fármaco,

quando associado a LDE (Maranhão *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005).

A associação com as drogas não altera as propriedades biológicas da nanoemulsão, tal como a capacidade de ligação a receptores de LDL. Complexos estáveis LDE-drogas com atividade citotóxica preservada das drogas associadas foram obtidos e foi demonstrado, em estudos *in vitro* e *in vivo*, que os efeitos secundários dos fármacos antineoplásicos foram notavelmente reduzidos (Maranhão *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005). A associação LDE-paclitaxel comprovou ser muito menos tóxica e demonstrou capacidade de concentrar a droga nos locais tumorais (Dias *et al.*, 2007).

Deste modo, inferimos a hipótese de aplicação desta tecnologia e classe de fármacos no tratamento da endometriose profunda em sua forma mais agressiva, e, para isso, iniciamos a viabilização desta possibilidade por meio de pesquisa da presença de “porta de entrada” das nanoemulsões, que são os receptores de LDL.

## **5.2 Determinação proteica por imunistoquímica dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1)**

Os resultados observados por meio da análise qualitativa do *score* de intensidade de determinação proteica dos receptores LDL-R e LRP-1 foram diferentes da expressão gênica, pois demonstraram que não foi possível identificar entre quais grupos (com e sem endometriose) e locais de avaliação (endométrio e lesão de endometriose) ocorreram diferenças no *score* de intensidade de marcação para LDL-R ( $p > 0,05$ ), mas sugere que a intensidade de marcação para LDL-R é maior no endométrio do que na lesão das mulheres com EDT ( $p = 0,053$ ).

Embora as proteínas sejam moléculas funcionais para os processos fisiológicos mais relevantes, estudos que comparam o RNA mensageiro (RNAm) com a abordagem proteômica podem apresentar diferentes resultados, pois as variações na quantidade de proteína nem sempre se

correlacionam com níveis de RNAm e as proteínas podem ser modificadas na sua estrutura em função de alterações pós-tradução, incluindo a maturação proteolítica, fosforilação, glicosilação, as quais só podem ser detectadas por meio do estudo das proteínas diretamente (Evans *et al.*, 2014).

Em tecidos reprodutivos, LRP-1 é conhecido por ser expresso na placenta (Zheng *et al.*,1994; Fischer *et al.*,2001), nos ovários (Moestrup *et al.*, 1992; Zheng *et al.*,1994) e no endométrio (Moestrup *et al.*,1992; Zheng *et al.*,1994; Sayegh *et al.*,1995; Foca *et al.*, 2000).

No estudo de Sayegh *et al.*, houve acentuada coloração por imunohistoquímica de LRP-1 em estroma endometrial tanto na fase proliferativa quanto na fase secretora (Sayegh *et al.*, 1995), enquanto epitélio e glândulas endometriais resultaram uniformemente negativos (Moestrup *et al.*, 1992, Sayegh *et al.*, 1995). Entretanto, Foca *et al.* observaram que a expressão de RNAm de LRP-1 no endométrio humano foi significativamente maior na fase secretora quando comparada com a fase proliferativa do ciclo menstrual (Foca *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, dividimos, também, as pacientes em fase proliferativa e secretora, e essa divisão, apesar de aleatória, deu-se de forma homogênea com 52,6% das pacientes do grupo sem endometriose na fase proliferativa e 47,4% na fase secretora. No grupo com endometriose, havia 55% de pacientes na fase proliferativa e 45% na fase secretora. As pacientes foram classificadas por meio do dateamento determinado pela data da última menstruação informada no dia do procedimento cirúrgico, o qual definimos como fase proliferativa do primeiro ao décimo quarto dia e como fase secretora, do décimo quarto ao vigésimo oitavo.

De acordo com Ecochard e Gougeon, o ciclo menstrual “normal” (intervalo entre o primeiro dia da menstruação para início da próxima menstruação) em mulheres jovens e saudáveis com fertilidade comprovada é de 28 dias, e os estudos de ultrassom e hormonais mostram que mulheres com idade entre 19-42 anos têm fases foliculares de 14,6 dias de duração e fases lútea de 13,6 dias de duração (Ecochard & Gougeon 2000).

Observamos, em nosso estudo, que, na análise de determinação proteica por imunohistoquímica dos receptores de LDL, não houve diferença na

intensidade de marcação influenciada pela fase do ciclo menstrual, porém, na análise por expressão de RNAm dos mesmos receptores, foi evidenciado que os níveis de RNAm de LDL-R no endométrio de mulheres com endometriose foram maiores na fase secretora ( $p = 0,001$ ), assim como os níveis de RNAm do LRP-1 também foram maiores na fase secretora no endométrio de mulheres sem endometriose ( $p=0,008$ ). Esses achados foram compatíveis com os resultados do estudo de Foca *et al.* (Foca *et al.*, 2000).

A ação do LRP-1 tem sido amplamente estudada no mecanismo de remodelação endometrial durante todo o ciclo menstrual como responsável pelo clearance de MMPs (matriz metaloproteinases) por meio de sua capacidade de ligação e endocitose, promovendo internalização e dissociação em ambiente ácido (Emonard *et al.*, 2004).

Após a entrega do conteúdo de LRP-1 nos lisossomas para degradação, o receptor é reciclado para a superfície celular para novo ciclo de endocitose. Tal mecanismo de depuração é particularmente efetivo para eliminar as proteinases (Casslen *et al.*, 1998). Isto diminui consideravelmente a atividade fibrinolítica no endométrio durante a fase secretora do ciclo (Lillis *et al.*, 2008).

Desta forma, a MMP-2 e MMP-9 são eficientemente eliminadas do estroma do endométrio durante as fases proliferativa e secretora. Esse controle é importante para estas gelatinases, em especial, a forma ativa de MMP-2, que estão presentes no endométrio durante o ciclo, isto é, durante períodos quando a degradação excessiva do estroma não deve ocorrer (Selvais *et al.*, 2009).

### **5.3 Correlação de receptores de LDL com o índice de massa corpórea (IMC)**

De acordo com os resultados do nosso estudo, foi observado que o IMC apresentou correlação positiva com o score de intensidade de marcação para LDL-R no endométrio de mulheres sem endometriose ( $p = 0,048$ ) e, com os níveis de RNAm do LRP-1 na lesão de endometriose ( $p = 0,024$ ), o que sugere que indivíduos com relação desfavorável de peso e altura podem

expressar mais intensamente esta família de receptores tanto no endométrio de pacientes sem a doença quanto na lesão de endometriose, isto posto pela determinação proteica e expressão gênica, respectivamente.

Não há na literatura qualquer estudo que tenha avaliado a associação do índice de massa corpórea com a expressão desta família de receptores em endométrio ou lesões de endometriose e, assim, abre-se oportunidade para nova linha de pesquisa.

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados de nossa pesquisa, concluímos que:

- a) Houve maior expressão Gênica de receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) em membrana celular de focos de endometriose profunda intestinal. Este achado não teve similaridade com a determinação proteica;
- b) Não houve diferença na comparação da expressão Gênica, assim como na determinação proteica, dos receptores de LDL (LDL-R e LRP-1) no endométrio de mulheres com e sem endometriose;
- c) Houve redução dos níveis séricos de LDL colesterol em pacientes com endometriose profunda em comparação com mulheres sem a doença.



## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo com Endometriose).

#### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO COM ENDOMETRIOSE**

#### **DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:.....

BAIRRO: .....CIDADE .....

CEP:.....TELEFONE (DDD): (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....Nº.....APTO:.....

BAIRRO: ..... CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE(DDD): (.....).....

## DADOS SOBRE A PESQUISA

### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

a. **A expressão de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda para viabilização do uso de nanoemulsão lipídica carreadora de droga anti proliferativa.**

### 2. PESQUISADOR: **Dr. Luciano Gibran**

**CARGO/FUNÇÃO:** Pós-Graduando do Departamento da Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:** 76.149

**UNIDADE DO HCFMUSP:** Disciplina de Ginecologia HCFMUSP

### 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- i. RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
ii. RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

### 5. SOBRE A PESQUISA:

#### 5.1 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

A endometriose é uma doença ginecológica que acontece quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritônio. Esta doença pode causar dores intensas no abdome, principalmente cólicas no período menstrual, comprometendo seriamente a qualidade de vida das mulheres.

A Senhora está sendo convidada a participar do estudo que vai avaliar a presença de receptores de LDL (células do sangue responsáveis pelo transporte de colesterol = gordura) em pessoas que tem endometriose.

Algumas doenças podem causar aumento dos níveis de colesterol nos tecidos como “fonte de energia”, conseqüentemente, os níveis de colesterol do sangue podem apresentar-se diminuídos. Esse projeto tem como objetivo verificar se este fenômeno ocorre também em pacientes com endometriose.

Sua participação neste estudo será como paciente controle (sem endometriose), pois é necessário comparar pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose. A cirurgia de abdome para as pacientes controle será realizada nas pacientes que desejam realizar a laqueadura tubária como método anticoncepcional.

Para isso, será feita uma pesquisa em laboratório para investigar no sangue e no material de biópsia removido durante a vídeolaparoscopia para laqueadura tubária, a qual a senhora será submetida, se o tecido sadio removido recebe menos colesterol comparado ao tecido acometido por endometriose.

## **5.2 – PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS:**

A senhora será submetida a uma videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 pequenos cortes na pele e os médicos realizarão a cirurgia observando o interior da barriga em uma televisão. Durante a cirurgia, o seu médico realizará a laqueadura tubária e removerá uma pequena amostra de tecido sadio chamado peritônio, que é um tecido de revestimento interno do abdômen, próximo a região das tubas uterinas e também uma pequena amostra de endométrio normal, tecido de revestimento que se localiza dentro do útero. Estes tecidos serão enviados ao Laboratório de Metabolismos de Lípidos do INCOR para análise da presença de receptores de LDL (colesterol) para podermos realizar a pesquisa que estamos propondo.

### **5.3 – RISCOS RELACIONADOS AOS PROCEDIMENTOS:**

Os riscos da obtenção dos tecidos no intra-operatório da videolaparoscopia são mínimos e não causam transtornos à sua saúde.

Antes da cirurgia, será retirada uma amostra de sangue para fazer outros exames relacionados com a gordura no sangue. Os riscos decorrentes desses exames são mínimos, relacionados à picada na veia que pode deixar uma mancha roxa no local. Para a realização deste exame e da cirurgia laparoscópica é necessário estar 12 horas em jejum.

### **5.4 – DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:**

A pesquisa não oferece risco ou desconforto pois a remoção dos fragmentos de tecido sadio (peritônio e endométrio) serão representados por uma diminuta porção, as quais não oferecem qualquer dano à integridade do paciente.

### **5.5 – BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:**

Com esta pesquisa, a qual a senhora está participando, tentaremos descobrir se os achados encontrados poderão ajudar futuras pacientes em seu tratamento. Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que a senhora não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Caso a senhora não concorde em doar o fragmento de tecido para pesquisa, nada influenciará o seu tratamento. Salientamos que a senhora tem a liberdade de retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejuízos a seu cuidado e que terá direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa e toda assistência necessária caso assim o desejar.

Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos no endereço abaixo especificado. Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX:3069-6442ramal26– e-mail:cappesq@hcnet.usp.br

## 5.6 – CUSTOS

A senhora não terá custos ao participar do estudo.

## 5.7 – TRATAMENTO ALTERNATIVO:

Não existem diferenças nos tratamentos realizados em virtude de sua participação ou não neste estudo.

## 6 – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Sua participação no presente estudo é voluntária.

A senhora pode optar por não participar ou interromper sua participação no estudo a qualquer momento sem sanção nem perda de benefícios aos quais pudesse ter direito. Se decidir interromper antes de terminar o estudo, será solicitado a voltar ao consultório/hospital para uma visita final.

Havendo interesse subsequente da paciente, os pesquisadores se comprometem a descartar as amostra colhidas imediatamente após notificação oficial da paciente ou de seus representantes legais.

O pesquisador assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo.

O **Dr. Luciano Gibran** pode retirar a senhora do estudo sem o seu consentimento por qualquer uma das seguintes razões:

- a) Com base em critérios para melhorar seu atendimento médico;
- b) Se a senhora deixar de seguir o esquema do estudo;
- c) Desenvolvimento de efeitos adversos graves.

**7 – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

O Dr. Luciano Gibran estará à sua disposição a qualquer momento para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito deste estudo e sua participação.

O consultório do Dr. Luciano Gibran fica a Rua Cotoxó, 611 cj. 103 e o número do telefone de seu consultório é (11) 3865-8319, durante o horário comercial.

Se o desenho do estudo ou o uso da informação forem alterados ou se surgir alguma descoberta significativa durante o estudo que possam afetar seu desejo em participar, a senhora será informada e será obtido novamente o seu consentimento.

Se tiver quaisquer dúvidas sobre seus direitos como indivíduo de pesquisa ou queixas referentes a este estudo, a senhora deverá telefonar para:

***Dr. Luciano Gibran***

*End.: Rua Cotoxó nº 611, conj. 103, Bairro Pompéia, São Paulo*

*Tel. 11- 3865-8319 – CEP: 05020-010*

**8 – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

---

---

## 9 – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, reconheço que li e compreendi a informação precedente descrevendo este estudo. Minhas dúvidas foram satisfatoriamente esclarecidas e estou assinando este termo de consentimento livre e esclarecido indicando meu desejo de participar. Compreendo que receberei uma cópia assinada deste termo.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, não abdiquei de nenhum de meus direitos legais aos quais eu pudesse fazer jus como participante de um estudo de pesquisa.

São Paulo, .....de.....de.....

-----

Assinatura do paciente/representante legal

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**7.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo sem Endometriose).**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
GRUPO SEM ENDOMETRIOSE**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL  
LEGAL**

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:.....

BAIRRO: .....CIDADE .....

CEP:.....TELEFONE (DDD): (.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....Nº.....APTO:.....

BAIRRO: ..... CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE(DDD): (.....).....

## DADOS SOBRE A PESQUISA

### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

a. **A expressão de receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose profunda para viabilização do uso de nanoemulsão lipídica carreadora de droga anti proliferativa.**

### 2. PESQUISADOR: **Dr. Luciano Gibran**

**CARGO/FUNÇÃO:** Pós-Graduando do Departamento da Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:** 76.149

**UNIDADE DO HCFMUSP:** Disciplina de Ginecologia HCFMUSP

### 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- i. RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
ii. RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

### 5. SOBRE A PESQUISA:

#### 5.1 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

A endometriose é uma doença ginecológica que acontece quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritônio. Esta doença pode causar dores intensas no abdome, principalmente cólicas no período menstrual, comprometendo seriamente a qualidade de vida das mulheres.

A Senhora está sendo convidada a participar do estudo que vai avaliar a presença de receptores de LDL (células do sangue responsáveis pelo transporte de colesterol = gordura) em pessoas que tem endometriose.

Algumas doenças podem causar aumento dos níveis de colesterol nos tecidos como “fonte de energia”, conseqüentemente, os níveis de colesterol do sangue podem apresentar-se diminuídos. Esse projeto tem como objetivo verificar se este fenômeno ocorre também em pacientes com endometriose.

Sua participação neste estudo será como paciente controle (sem endometriose), pois é necessário comparar pacientes com endometriose e pacientes sem endometriose. A cirurgia de abdome para as pacientes controle será realizada nas pacientes que desejam realizar a laqueadura tubária como método anticoncepcional.

Para isso, será feita uma pesquisa em laboratório para investigar no sangue e no material de biópsia removido durante a vídeolaparoscopia para laqueadura tubária, a qual a senhora será submetida, se o tecido sadio removido recebe menos colesterol comparado ao tecido acometido por endometriose.

## **5.2 – PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS:**

A senhora será submetida a uma videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 pequenos cortes na pele e os médicos realizarão a cirurgia observando o interior da barriga em uma televisão. Durante a cirurgia, o seu médico realizará a laqueadura tubária e removerá uma pequena amostra de tecido sadio chamado peritônio, que é um tecido de revestimento interno do abdômen, próximo a região das tubas uterinas e também uma pequena amostra de endométrio normal, tecido de revestimento que se localiza dentro do útero. Estes tecidos serão enviados ao Laboratório de Metabolismos de Lípidos do INCOR para análise da presença de receptores de LDL (colesterol) para podermos realizar a pesquisa que estamos propondo.

### **5.3 – RISCOS RELACIONADOS AOS PROCEDIMENTOS:**

Os riscos da obtenção dos tecidos no intra-operatório da videolaparoscopia são mínimos e não causam transtornos à sua saúde.

Antes da cirurgia, será retirada uma amostra de sangue para fazer outros exames relacionados com a gordura no sangue. Os riscos decorrentes desses exames são mínimos, relacionados à picada na veia que pode deixar uma mancha roxa no local. Para a realização deste exame e da cirurgia laparoscópica é necessário estar 12 horas em jejum.

### **5.4 – DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:**

A pesquisa não oferece risco ou desconforto pois a remoção dos fragmentos de tecido sadio (peritônio e endométrio) serão representados por uma diminuta porção, as quais não oferecem qualquer dano à integridade do paciente.

### **5.5 – BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:**

Com esta pesquisa, a qual a senhora está participando, tentaremos descobrir se os achados encontrados poderão ajudar futuras pacientes em seu tratamento. Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que a senhora não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Caso a senhora não concorde em doar o fragmento de tecido para pesquisa, nada influenciará o seu tratamento. Salientamos que a senhora tem a liberdade de retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejuízos a seu cuidado e que terá direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa e toda assistência necessária caso assim o desejar.

Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos no endereço abaixo especificado. Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX:3069-6442ramal26– e-mail:cappesq@hcnet.usp.br

**5.6 – CUSTOS:**

A senhora não terá custos ao participar do estudo.

**5.7 – TRATAMENTO ALTERNATIVO:**

Não existem diferenças nos tratamentos realizados em virtude de sua participação ou não neste estudo.

**6 – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:**

Sua participação no presente estudo é voluntária.

A senhora pode optar por não participar ou interromper sua participação no estudo a qualquer momento sem sanção nem perda de benefícios aos quais pudesse ter direito. Se decidir interromper antes de terminar o estudo, será solicitado a voltar ao consultório/hospital para uma visita final.

Havendo interesse subsequente da paciente, os pesquisadores se comprometem a descartar as amostra colhidas imediatamente após notificação oficial da paciente ou de seus representantes legais.

O pesquisador assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo.

O **Dr. Luciano Gibran** pode retirar a senhora do estudo sem o seu consentimento por qualquer uma das seguintes razões:

- a) Com base em critérios para melhorar seu atendimento médico;
- b) Se a senhora deixar de seguir o esquema do estudo;
- c) Desenvolvimento de efeitos adversos graves.

**7 – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

O Dr. Luciano Gibran estará à sua disposição a qualquer momento para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito deste estudo e sua participação.

O consultório do Dr. Luciano Gibran fica a Rua Cotoxó, 611 cj. 103 e o número do telefone de seu consultório é (11) 3865-8319, durante o horário comercial.

Se o desenho do estudo ou o uso da informação forem alterados ou se surgir alguma descoberta significativa durante o estudo que possam afetar seu desejo em participar, a senhora será informada e será obtido novamente o seu consentimento.

Se tiver quaisquer dúvidas sobre seus direitos como indivíduo de pesquisa ou queixas referentes a este estudo, a senhora deverá telefonar para:

***Dr. Luciano Gibran***

*End.: Rua Cotoxó nº 611, conj. 103, Bairro Pompéia, São Paulo*

*Tel. 11- 3865-8319 – CEP: 05020-010*

**8 – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

---

---

## 9 – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, reconheço que li e compreendi a informação precedente descrevendo este estudo. Minhas dúvidas foram satisfatoriamente esclarecidas e estou assinando este termo de consentimento livre e esclarecido indicando meu desejo de participar. Compreendo que receberei uma cópia assinada deste termo.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, não abdiquei de nenhum de meus direitos legais aos quais eu pudesse fazer jus como participante de um estudo de pesquisa.

São Paulo, .....de.....de.....

-----

Assinatura do paciente/representante legal

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### 7.3 Anexo C – Tabela com os dados das pacientes e suas características físicas.

n	n° caderno	Paciente	Nome	Idade	Peso (Kg)	Estatura (cm)	IMC	Fase do Ciclo
1	1	Caso	MARICELMA	32	65	154	27,4	secretora
2	4	Caso	LUCIANA	29	64	172	21,6	proliferativa
3	5	Caso	ANGELA	44	62	170	21,5	proliferativa
4	7	Controle	ANA PAULA	32	85	168	30,1	secretora
5	15	Caso	JULIANA	26	62	158	24,8	secretora
6	17	Caso	ANDREA	35	67	165	24,6	proliferativa
7	21	Caso	DEBORA	42	73	158	29,2	secretora
8	25	Caso	CAROLY	48	93,5	172	31,6	proliferativa
9	26	Caso	LIANE	32	54	152	23,4	proliferativa
10	27	Caso	ALESSANDRA	35	57	153	24,3	secretora
11	28	Caso	ANDREA	38	71	169	24,9	proliferativa
12	29	Caso	JULIA	30	45,5	158	18,2	secretora
13	30	Caso	GABRIELA	36	55,8	162	21,3	proliferativa
14	31	Caso	PATRICIA	37	51	163	19,2	secretora
15	34	Caso	DENISE	31	76	173	25,4	secretora
16	37	Caso	GENI	47	63,5	153	27,1	proliferativa
17	38	Caso	VERONICA	39	56,1	157	22,8	secretora
18	39	Caso	FATIMA	41	63,9	162	24,4	secretora
19	40	Caso	FLAVIA	31	53,6	153	22,9	proliferativa
20	41	Caso	CINTIA	28	61,5	163	23,1	proliferativa
21	42	Caso	PATRICIA	32	57	153	24,3	proliferativa
22	43	Controle	DANIELA	35	67	165	24,6	secretora
23	44	Controle	JOELMA	24	69	161	26,6	secretora
24	45	Controle	LUANA	28	78	174	25,8	secretora
25	46	Controle	FABIANA	29	75	165	27,5	proliferativa
26	47	Controle	MARIVANEIDE	30	82	169	28,7	proliferativa
27	49	Controle	TATIANA	33	80	180	24,7	proliferativa
28	50	Controle	LUCIANA	32	60	169	21,0	secretora
29	51	Controle	MARIA MELO	41	88	172	29,7	secretora
30	52	Controle	LIDIA	28	67	159	26,5	proliferativa
31	53	Controle	ELISABETE	43	73	167	26,2	proliferativa
32	54	Controle	CLAUDIA	44	67	165	24,6	proliferativa
33	55	Controle	ANA	32	60	166	21,8	proliferativa
34	56	Controle	MARIA NOVAIS	32	80	165	29,4	secretora
35	57	Controle	REGINA CÉLIA	44	72	158	28,8	proliferativa
36	59	Controle	ROSA	31	73	152	31,6	proliferativa
37	60	Controle	RENATA	32	65	160	25,4	secretora
38	61	Controle	EDILENE	32	74	162	28,2	proliferativa
39	64	Controle	LOURDES	36	86	167	30,8	secretora

**7.4 Anexo D – Tabela com o perfil lipídico das pacientes**

n	nº caderno	Paciente	CT	HDL-C	LDL-C	TG	APO A1	APO B100
1	1	Caso	174	39	114	102	197,1	134,7
2	4	Caso	186	39	120	137	96,9	79
3	5	Caso	191	46	114	153	149,4	70,7
4	7	Controle	179	46	121,6	57	154,1	79
5	15	Caso	144	34	94	79	97,3	61,3
6	17	Caso	177	47	103	137	157,8	62,7
7	21	Caso	145	37	91	85	99,9	59,5
8	25	Caso	220	47	129	222	167,9	86,2
9	26	Caso						
10	27	Caso	189	49	111	140	149,3	62,5
11	28	Caso	189	54	116	94	146,3	83,1
12	29	Caso	182	48	108	128	137,6	71,1
13	30	Caso	179	54	105	99	158	55,5
14	31	Caso						
15	34	Caso	194	54	116	123	135,4	72,9
16	37	Caso	255	39	180	183	81,8	108,9
17	38	Caso	185	31	123	154	107,8	69,3
18	39	Caso	155	41	99	74	98,1	51,6
19	40	Caso	221	25	162	170	86,1	93,5
20	41	Caso						
21	42	Caso	195	32	136	139	111,3	68,8
22	43	Controle	191	22	155	71	102,4	66,1
23	44	Controle	195	40	133	113	121,1	75,3
24	45	Controle	197	54	118	124	127	77,3
25	46	Controle	215	35	162	90	118,9	92,1
26	47	Controle	196	52	171	123	157,7	92,7
27	49	Controle	173	52	161	62	146,8	65,3
28	50	Controle	141	40	131	52	125	64,8
29	51	Controle	161	32	145	82	117,7	88,5
30	52	Controle	185	90	176	47	171,1	42,7
31	53	Controle	306	37	254	259	125,3	161,5
32	54	Controle	248	45	217	155	155,8	128,4
33	55	Controle	180	44	154	129	156,8	77,8
34	56	Controle	168	39	130	189	125,2	143,5
35	57	Controle	210	39	182	138	140,5	121,5
36	59	Controle	148	38	116	160	131,4	65
37	60	Controle	184	48	163	106	169	80,7
38	61	Controle	225	35	152	188	136,8	124,5
39	64	Controle	176	32	120	119	111,3	95,8

## 7.5 Anexo E – Tabela com os dados de expressão gênica

n	n° caderno	Paciente	LDL-R		LRP-1	
			Endométrio	Endometriose	Endométrio	Endometriose
1	1	Caso	0,01	0,08	0,05	0,99
2	4	Caso	0,01	0,02	0,17	0,13
3	5	Caso	0,01	0,00	0,06	0,03
4	7	Controle	0,01		0,12	
5	15	Caso	0,02	0,03	0,05	0,30
6	17	Caso	0,00	0,03	0,06	0,30
7	21	Caso	0,01	0,03	0,04	0,22
8	25	Caso	0,01	0,02	0,02	0,37
9	26	Caso	0,00	0,06	0,05	0,23
10	27	Caso	0,04	0,03	0,04	0,35
11	28	Caso	0,01	0,07	0,05	0,47
12	29	Caso	0,01	0,01	0,10	0,30
13	30	Caso	0,01	0,00	0,04	0,27
14	31	Caso	0,02	0,04	0,07	0,20
15	34	Caso	0,01	0,01	0,05	0,18
16	37	Caso	0,00	0,02	0,31	0,52
17	38	Caso	0,02	0,02	0,07	0,07
18	39	Caso	0,01	0,01	0,13	0,33
19	40	Caso	0,01	0,01	0,04	0,13
20	41	Caso	0,00	0,01	0,12	0,47
21	42	Caso	0,01	0,01	0,26	0,27
22	43	Controle	0,03		0,38	
23	44	Controle	0,03		0,15	
24	45	Controle	0,02		0,14	
25	46	Controle	0,02		0,05	
26	47	Controle	0,02		0,06	
27	49	Controle	0,02		0,10	
28	50	Controle	0,01		0,12	
29	51	Controle	0,04		0,19	
30	52	Controle	0,02		0,10	
31	53	Controle	0,01		0,10	
32	54	Controle	0,01		0,11	
33	55	Controle	0,01		0,08	
34	56	Controle	0,01		0,10	
35	57	Controle	0,03		0,12	
36	59	Controle	0,00		0,17	
37	60	Controle	0,02		0,13	
38	61	Controle	0,01		0,04	
39	64	Controle	0,04		0,12	

### 7.6 Anexo F – Tabela com os dados de determinação proteica.

n	nº caderno	Paciente	LDL-R		LRP-1	
			Endométrio	Endometriose	Endométrio	Endometriose
1	1	Caso	4	4	3	3
2	4	Caso	3	2	4	2
3	5	Caso	4	3	3	3
4	7	Controle	4		4	
5	15	Caso	4	3	4	3
6	17	Caso	3	3	3	2
7	21	Caso	3	2	3	2
8	25	Caso	3	2	3	1
9	26	Caso	2	3	3	3
10	27	Caso	4	3	4	3
11	28	Caso	4	3	3	3
12	29	Caso	2	2	3	3
13	30	Caso	3	2	3	3
14	31	Caso	4	2	4	3
15	34	Caso	3	2	4	1
16	37	Caso	4	3	3	2
17	38	Caso	3	2	3	1
18	39	Caso	3	3	1	2
19	40	Caso	4	2	4	1
20	41	Caso	4	4	2	3
21	42	Caso	3	2	3	3
22	43	Controle	4		4	
23	44	Controle	4		4	
24	45	Controle	4		4	
25	46	Controle	4		3	
26	47	Controle	4		3	
27	49	Controle	4		4	
28	50	Controle	4		3	
29	51	Controle	4		3	
30	52	Controle	3		3	
31	53	Controle	4		3	
32	54	Controle	3		3	
33	55	Controle	3		3	
34	56	Controle	4		4	
35	57	Controle	4		3	
36	59	Controle	4		4	
37	60	Controle	3		4	
38	61	Controle	4		4	
39	64	Controle	4		3	

**7.7 Anexo G – Aprovação CAPPesq - HCFMUSP.**

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

**Nº Protocolo: 0417/11**

**Título:** A EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE LDL EM MEMBRANA CELULAR DE FOCOS DE ENDOMETRIOSE PERITONEAL PROFUNDA PARA VIABILIZAÇÃO DO USO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CARREADORA DE DROGA ANTI PROLIFERATIVA

**Pesquisador Responsável:** Sergio Podgaec

**Pesquisador Executante:** Luciano Gibran

**Finalidade Acadêmica:** Mestrado

**Departamento:** OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 19/10/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 21 de Outubro de 2011

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq



## 9 REFERENCIAS

1. Abdalla-Ribeiro HS, Galvão MA, Aoki T, Aldrighi JM, Ribeiro PA. Anti-apoptotic activity in deep pelvic endometriosis. *Histol Histopathol*. 2013;29(9):1129-33.
2. Abrao MS, Podgaec S, Dias JA Jr, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF, Carvalho FM. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril*. 2006;86(3):543-7.
3. Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol*. 2001;82(1):84-7.
4. Ades PA, Savage PD. Potential benefits of weight loss in coronary heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(4):448–56.
5. Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2005;97(1):178-82.
6. Bassi MA, Podgaec S, Dias Júnior JA, Sobrado CW, D Amico Filho N. [Bowel endometriosis: a benign disease?]. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(5):611-6.
7. Baum L, Dong ZY, Choy KW, Pang CP, Ng HK. Low-density lipoprotein receptor-related protein gene amplification and 766T polymorphism in astrocytomas. *Neuroscience Lett*. 1998;256:5-8.
8. Benagiano G, Brosens I, Lippi D. The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2014;78(1):1-9.
9. Breslow JL. Insights into lipoprotein metabolism from studies in transgenic mice. *Annu Rev Physiol*. 1994;56:797-810.
10. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; 232(4746):34-47.
11. Brown MS, Goldstein JL. The hyperlipoproteinemias and other disorders of lipid metabolism. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 13<sup>th</sup>ed. New York: Mc Graw-Hill 1994; 2058-69.

12. Brown J, Farquhar C. Endometriosis: an overview of cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Mar 10;3:CD009590.
13. Bulgarelli A, Leite AC Jr, Dias AA, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013;27(6):531-9.
14. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev*. 2005;57(3):359-83.
15. Casslen B, Gustavsson B, Angelin B, Gafvels M. Degradation of urokinase plasminogen activator (UPA) in endometrial stromal cells requires both the UPA receptor and the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(6):585-93.
16. Catusus L, Gallardo A, Llorente-Cortes V, Escuin D, Munoz J, Tibau A, Peiro G, Barnadas A, Lerma E. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 is associated with pro-liferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2011a;42(11):1581-8.
17. Catusus L, Llorente-Cortes V, Cuatrecasas M, Pons C, Espinosa I, Prat J. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) is associated with highgrade, advanced stage and p53 and p16 alterations in endometrial carcinomas. *Histopathology*. 2011b; 59(3):567-71.
18. Contente TC, Kretzer IF, Filippin-Monteiro FB, Maria DA, Maranhão RC. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(12):1698-709.
19. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990;53(6):978-83.
20. Coronado C, Franklin RR, Lotze EC, Bailey HR, Valdés CT. Surgical treatment of symptomatic colorectal endometriosis. *Fertil Steril*. 1990;53(3):411-6.
21. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 955:11-22.
22. Davis ME, Chen ZG. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Rev*. 2008;7:771-82.

23. Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhão RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59(1):105-11.
24. Donnez J, Squifflet J. Complications, pregnancy and recurrence in a prospective series of 500 patients operated on by the shaving technique for deep rectovaginal endometriotic nodules. *Hum Reprod.* 2010;25(8):1949-58.
25. Dorlhiac-Llacer PE, Marquezini MV, Toffoletto O, Carneiro RC, Maranhão RC, Chamone DA. In vitro cytotoxicity of the LDE: daunorubicin complex in acute myelogenous leukemia blast cells. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(10):1257-63.
26. Ecochard R, Gougeon A. Side of ovulation and cycle characteristics in normally fertile women. *Hum Reprod.* 2000;15(4):752-5.
27. Emonard H, Théret L, Bennasroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol.* 2014;62(2):84-90
28. Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, Henriet P, Marbaix E, Kirkegaard K, Patthy L, Eeckhout Y, Nagase H, Hornebeck W, Courtoy PJ. Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2, TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54944–51.
29. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24(2):235-58.
30. Evans GE, Martínez-Conejero JA, Phillipson GT, Sykes PH, Sin IL, Lam EY, Print CG, Horcajadas JA, Evans JJ. In the secretory endometria of women, luminal epithelia exhibit gene and protein expressions that differ from those of glandular epithelia. *Fertil Steril.* 2014;102(1):307-17
31. Fernandez H, Lucas C, Hédon B, Meyer JL, Mayenga JM, Roux C. One year comparison between two add-back therapies in patients treated with a GnRH agonist for symptomatic endometriosis: a randomized double-blind trial. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1465-71.
32. Fischer U, Birkenmeier G, Horn LC. Localization of  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor in third trimester human placentas: a preliminary immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest.* 2001;52(1):22–5.
33. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013;309(1):71-82.

34. Foca C, Moses EK, Quinn MA, Rice GE. Differential expression of the  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor and the receptor associated protein in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(10):921-7.
35. Franklin BA, Durstine JL, Roberts CK, Barnard RJ. Impact of diet and exercise on lipid management in the modern era. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28(3):405-21.
36. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
37. Gibran L, Maranhão RC, Abrão MS, Baracat EC, Podgaec S. Could statins constitute a novel treatment for endometriosis? Systematic review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;179:153-8.
38. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1982; 257(14):8216-27.
39. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B eds. *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7<sup>th</sup>ed, Vol 2. New York: Mc Graw-Hill 1995;1981-2030.
40. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-8
41. Gopal U, Bohonowych JE, Lema-Tome C, Liu A, Garrett-Mayer E, Wang B, Isaacs JS. A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP-1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion. *PLoS One*. 2011;6(3):e17649.
42. Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amâncio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2002;85(3):493-7.
43. Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, Kuga D, Amzajerdi AN, Soto H, Zhu S, Babic I, Tanaka K, Dang J, Iwanami A, Gini B, DeJesus J, Lisiero DD, Huang TT, Prins RM, Wen PY, Robins HI, Prados MD, DeAngelis LM, Mellinghoff IK, Mehta MP, James CD, Chakravarti A, Cloughesy TF, Tontonoz P, Mischel PS. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov*. 2011;1(5):442-56.
44. Henry M, Kronenberg MD, Shlomo Melmed MD, Kenneth S, Polonsky MDP. Disorders of lipid metabolism. In: Reed Larsen MD FACP FRCP, *Williams textbook of endocrinology* [Hardcover]. 2011-Cap. 23.

45. Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 1988;7(13):4119-27.
46. Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 1978;52(6):1099-114.
47. Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, Ke AW, Wang Y, Wang XY, Shi YH, Xiao YS, Ding ZB, Dai Z, Xu Y, Jia WP, Tang ZY, Fan J, Zhou J. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PloS One.* 2012;7(3):e32775.
48. Hungria VT, Latrilha MC, Rodrigues DG, Bydlowski SP, Chiattoni CS, Maranhão RC. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(1):51-60.
49. Jerby BL, Kessler H, Falcone T, Milsom JW. Laparoscopic management of colorectal endometriosis. *Surg Endosc.* 1999;13(11):1125-8.
50. Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcell Biochem.* 1997;28:235-76.
51. Kancha RK, Stearns ME, Hussain MM. Decreased expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. *Oncology Res.* 1994;6(8):365-72.
52. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(1):37-43.
53. Kok DE, van Roemund JG, Aben KK, den Heijer M, Swinkels DW, Kampman E, Kiemeny LA. Blood lipid levels and prostate cancer risk; a cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;14(4):340-5.
54. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril.* 2012;98(3):564-71.
55. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int.* 2014;2014:934261.
56. Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. *Cell Oncol.* 2012;35(6):451-60.

57. Kuroda K, Kitade M, Kikuchi I, Kumakiri J, Matsuoka S, Kuroda M, Takeda S. Peritoneal vascular density assessment using narrow-band imaging and vascular analysis software, and cytokine analysis in women with and without endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2010;17(1):21-5.
58. Lee BH, Taylor MG, Robinet P, Smith JD, Schweitzer J, Sehayek E, Falzarano SM, Magi-Galluzzi C, Klein EA, Ting AH. Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res.* 2013;73(3):1211–8.
59. Li Y, Wood N, Grimsley P, Yellowlees D, Donnelly PK. In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low-density lipoprotein receptor-related protein. *Invasion Metastasis.* 1998;18(5-6):240–51.
60. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev.* 2008;88(3):887-918.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
62. Lo Prete AC, Maria DA, Rodrigues DG, Valduga CJ, Ibañez OC, Maranhão RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(6):801-8.
63. Lopes MB, Bogaev CA, Gonias SL, Vanden Berg SR. Expression of alpha2 - macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein is increased in reactive and neoplastic glial cells. *FEBS Lett.* 1994;338:301–5.
64. Mahley RW. Biochemistry and physiology of lipid and lipoprotein metabolism. In: Becker KL, ed. *Principles and practice of endocrinology and metabolism.* 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott 1995; p.1369-78.
65. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25(12):1277-94.
66. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Pileggi FJ, Chamone DA. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(10):1003-7
67. Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993;28(8):691-6.

68. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994;54(17):4660-6.
69. Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49(6):487-98.
70. Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008;197(2):959-66.
71. Martinez-Botas J, Suarez Y, Ferruelo AJ, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *FASEB J.* 1999;13(11):1359-70.
72. Martinez-Botas J, Ferruelo AJ, Suarez Y, Fernandez C, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1532(3):185-94.
73. McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME. In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. *Prostate.* 1996;28(5):311-7.
74. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 2007;150(5):552-8
75. Melo AS, Rosa-e-Silva JC, Rosa-e-Silva AC, Poli-Neto OB, Ferriani RA, Vieira CS. Unfavorable lipid profile in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2433-6.
76. Mello SB, Tavares ER, Bulgarelli A, Bonfá E, Maranhão RC. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:443-9.
77. Meng H, Chen G, Zhang X, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, Beer DG, Wang MM. Stromal LRP-1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2426-33.
78. Mettler L, Ruprai R, Alkatout I. Impact of medical and surgical treatment of endometriosis on the cure of endometriosis and pain. *Biomed Res Int.* 2014;2014:264653.

79. Minelli L, Fanfani F, Fagotti A, Ruffo G, Ceccaroni M, Mereu L, Landi S, Pomini P, Scambia G. Laparoscopic colorectal resection for bowel endometriosis: feasibility, complications, and clinical outcome. *Arch Surg.* 2009;144(3):234-9.
80. Minko T, Khandare JJ, Vetcher AA, Soldatenkov VA, Garbuzenko OB, Saad M, Pozharov VP. Multifunctional pharmaceutical nanocarriers. In: Torchilin VP (Ed.). Series: *Fundamental biomedical technologies*. Springer 2008; p.309-35.
81. Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* 1992;269(3):375-82.
82. Montel V, Gaultier A, Lester R.D, Campana W.M, Gonias S.L. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res.* 2007;67(20):9817-24.
83. Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2285-95.
84. Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;955:1–10.
85. Nomura AM, Stemmermann GN, Chyou PH. Prospective study of serum cholesterol levels and large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(19):1403-7.
86. Pandolfino J, Hakimian D, Rademaker AW, Tallman MS. Hypocholesterolemia in hairy cell leukemia: a marker for proliferative activity. *Am J Hematol.* 1997;55(3):129-33.
87. Paulino DS, Surita FG, Peres GB, Nascimento SL, Morais SS. Association between parity, pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(6):880-4.
88. Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57(5):624-30.
89. Pitroda SP, Khodarev NN, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(14):5837-41.
90. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1373-9.

91. Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LF, Baracat EC, Abrao MS. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 68(4):301-8.
92. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2014;101(4):927-35.
93. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA Jr, Abrao MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;99(1):33-7.
94. Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*. 2002;54(6):765-72.
95. Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibañez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(6):565-76.
96. Rudling MJ, Angelin B, Peterson CO, Collins VP. Low density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumors and its relation to the cholesterol requirement. *Cancer Res*. 1990;50(3):483-7.
97. Saad M, Garbuzenko OB, Ber E, Chandna P, Khandare JJ, Pozharov VP, Minko T. Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging? *J Control Release*. 2008;130 (2):107-14.
98. Sayegh RA, Tao XJ, Issacson KB. Immunohistochemical localization of alpha-2 macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein, receptor-associated protein, and Gp330 in the human endometrium. *J Soc Gynecol Invest*.1995;2(6):748-53.
99. Selvais C, Gaide Chevonnay HP, Lemoine P, Dedieu S, Henriot P, Courtoy PJ, Marbaix E, Emonard H. Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation. *Endocrinology*. 2009;150:3792-9.
100. Schmittgen TD1, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
101. Sid B, Dedieu S, Delorme N, Sartelet H, Rath GM, Bellon G, Martiny L. Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1729-40.

102. Simko V, Ginter E Understanding cholesterol: high is bad but too low may also be risky - is low cholesterol associated with cancer? *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(2):59-65.
103. Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS. LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J*. 1995;9(10):890-8.
104. Sundelin JP, Stahlman M, Lundqvist A, Levin M, Parini P, Johansson ME, Borén J. Increased expression of the very low-density lipoprotein receptor mediates lipid accumulation in clear-cell renal cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48694.
105. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan S C, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J Med Res*. 2009;130(6):689-701.
106. Swanson CA, Potischman N, Barrett RJ, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Wilbanks GD, Hoover RN, Brinton LA. Endometrial cancer risk in relation to serum lipids and lipoprotein levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(7):575-81.
107. Tavares ER, Freitas FR, Diament J, Maranhão RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2297-304.
108. Teixeira RS, Valduga CJ, Benvenutti LA, Schreier S, Maranhão RC. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(10):1287-95.
109. Thomas EJ, Campbell IG. Molecular genetic defects in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;50(Suppl 1):44-50.
110. Tomiki Y, Suda S, Tanaka M, Okuzawa A, Matsuda M, Ishibiki Y, Sakamoto K, Kamano T, Tsurumaru M, Watanabe Y. Reduced low-density-lipoprotein cholesterol causing low serum cholesterol levels in gastrointestinal cancer: a case control study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004;23(2):233-40.
111. Valduga CJ1, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(12):1615-22.
112. Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. <sup>99m</sup>Tc-low density lipoprotein: intracellularly trapped radiotracer for noninvasive imaging of low density lipoprotein metabolism in vivo. *Semin Nucl Med*. 1990;20(1):68-79.
113. Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I, Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):349-71.

114. Vartiainen E, Laatikainen T, Tapanainen H, Puska P. Changes in serum cholesterol and diet in north Karelia and all Finland. *Glob Heart*. 2016;11(2):179-84.
115. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):177-200.
116. Vitols S, Angelin B, Ericsson S, Gahrton G, Juliusson G, Masquelier M, Paul C, Peterson C, Rudling M, Söderberg-Reid K. Uptake of low density lipoproteins by human leukemic cells in vivo: relation to plasma lipoprotein levels and possible relevance for selective chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2598-602.
117. Vlahos NF, Kalampokas T, Fotiou S. Endometriosis and ovarian cancer: a review. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(3):213-9.
118. Vlahos NF, Economopoulos KP, Fotiou S. Endometriosis, in vitro fertilisation and the risk of gynaecological malignancies, including ovarian and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2010;24(1):39-50.
119. de Vries TJ, Verheijen JH, de Bart AC, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. Decreased expression of both the low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha (2)-macroglobulin receptor and its receptor-associated protein in late stages of cutaneous melanocytic tumor progression. *Cancer Res*. 1996;56(6):1432-9.
120. Yamamoto M, Ikeda K, Ohshima K, Tsugu H, Kimura H, Tomonaga M. Increased expression of low-density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in human malignant astrocytomas. *Cancer Res*. 1997;57(13):2799-805.
121. Webb J. Cancer, its nature and its treatment. *Lancet*. 1901;158:976-8.
122. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 1991;252(5014):1817-22.
123. Zhang J, Srivastava S, Duffadar R, Davis JM, Rotello VM, Santore MM. Manipulating microparticles with single surface-immobilized nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(13):6404-8.
124. Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, Gp330 and LRP/a2MR, and the receptor associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*. 1994;42:531-42.