UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ALESSANDRA DE ARAUJO SILVA BEDIN

**Captação de nanopartícula lipídica marcada radioativamente por receptores de
LDL em membrana celular de focos de endometriose**

São Paulo
2017

Alessandra de Araujo Silva Bedin

**Captação de nanopartícula lipídica marcada radioativamente por receptores de
LDL em membrana celular de focos de endometriose**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Sergio Podgaec

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bedin, Alessandra de Araujo Silva

Captação de nanopartícula lipídica marcada
radioativamente por receptores de LDL em membrana
celular de focos de endometriose / Alessandra de
Araujo Silva Bedin. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Sergio Podgaec.

Descritores: 1.Endometriose 2.Receptores de LDL
3.Nanotecnologia 4.Colesterol 5.Nanopartículas
6.Lipoproteínas 7.Terapêutica

USP/FM/DBD-459/17

DEDICATÓRIA

*Com todo carinho e amor, dedico primeiramente esta conquista aos meus pais, **Roberto e Celina**. Agradeço pela paciência, pelo incentivo e pela dedicação, sempre inesgotáveis. Agradeço pelas inúmeras vezes que me disseram que o sucesso só vem com esforço, e que me encorajaram a lutar sempre. Que seja esta uma forma de retribuir tudo o que sempre fizeram por mim, e o seu exemplo de vida.*

*Com todo amor do mundo, também dedico esta vitória aos meus filhos, **Alexandre e Ana Beatriz**, agradeço pela paciência e pela compreensão nos momentos que aceitaram privar-se de minha companhia. Desejo que para os dois, que estão em formação, isto represente além do orgulho da etapa concluída, um grande incentivo ao caminho que ainda devem trilhar.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente ao amigo e orientador, **Prof. Dr. Sergio Podgaec**, pela brilhante e dedicada ajuda em todos os momentos deste trabalho. É muito gratificante e incentivadora a sua participação, não me deixando desistir diante dos obstáculos.*

*Também agradeço à equipe do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Incor-HCFMUSP, pela enorme colaboração em todas as etapas do projeto, destacando o **Prof. Dr. Raul C. Maranhão**, a **Dra. Elaine R. Tavares**, a **Dra Débora F. Deus** e aos demais participantes da equipe.*

*Agradeço ao **Prof. Dr. Edmund C Baracat**, do Depto de Obstetrícia e Ginecologia do HC-FMUSP, pela abertura dos caminhos para que este projeto pudesse ser desenvolvido.*

*E também aos **grandes amigos** que acumulei nestes caminhos da vida, cujos nomes não caberiam em uma página e cujo amor não cabe no peito.*

Muito obrigada a todos, de verdade.

RESUMO

Bedin AAS. Captação de nanopartícula lipídica marcada radioativamente por receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Entre 5,3 e 12% das mulheres com endometriose apresentam a forma mais severa da doença, com comprometimento profundo do intestino, cujo principal tratamento é cirúrgico, porém com alta taxa de complicações: recorrência das lesões, fístulas, hemorragias, infecção, suboclusão intestinal e disfunção vesical e/ou intestinal. O tratamento medicamentoso visa inibir o crescimento dos focos por meio do bloqueio ovariano, com boa redução da dor, mas sem diminuição dos nódulos endometrióticos, e maiores efeitos colaterais pela longa duração do tratamento. Atualmente, drogas podem ser acopladas a nanopartículas que tenham afinidade com tecidos doentes, de forma a serem entregues diretamente aos mesmos, sem efeitos sistêmicos significativos e com eficácia superior no controle das lesões. Há evidências de que células em alta divisão apresentam maior captação de LDL que células normais, para síntese de membrana. Em diversos tipos de câncer, doenças reumatológicas, aterosclerose, mieloma múltiplo e na cardiomiopatia diabética, a necessidade significativamente maior de LDL permitiu bons resultados terapêuticos acoplando-se um quimioterápico à LDE (nanoemulsão artificial semelhante à LDL e que se liga ao mesmo receptor). Na endometriose, assim como no câncer, há fatores de crescimento e citocinas associados à multiplicação celular, e também há superexpressão dos receptores de LDL nas lesões de endometriose. Além disso, mulheres com endometriose intestinal apresentam níveis plasmáticos menores de LDL que o grupo sadio. Este estudo avaliou a captação da emulsão de LDE marcada radioativamente pelos receptores na superfície do foco endometriótico, para posteriormente testar a capacidade da LDE de interiorização celular. Tratou-se de um estudo-piloto comparativo entre três grupos: endometriose intestinal e não-intestinal, e sem endometriose. Antes do tratamento cirúrgico, foi determinado o perfil lipídico das pacientes e foi injetada a LDE marcada. Foi dosada a radioatividade das amostras de tecidos coletados (endometriose intestinal e não-intestinal, peritôneosadio e endométrio tópico). Na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa nos parâmetros ($p > 0,01$), possivelmente devido à amostra pequena. Mas o grupo com endometriose intestinal tendeu a apresentar um IMC mais baixo que os demais, com maior

sintomatologia álgica e níveis mais altos de LDL. A captação de LDE no peritôneosadio foi maior no grupo com endometriose não intestinal. O endométrio tópico e os focos de endometriose intestinal captaram mais LDE que os de não-intestinal, sugerindo maior divisão celular e menos fibrose. A comparação da captação da LDE por local mostrou uma tendência a captação decrescente entre endométrio tópico, peritôneo sadio e lesão de endometriose. Como os focos de endometriose (intestinal ou não) captaram de maneira significativa a LDE, conclui--se que há consumo aumentado de LDL nas lesões de endometriose, assim como no câncer e nas doenças inflamatórias. Não houve diferença dos níveis de colesterol plasmático na captação da LDE, comprovando a entrega direta da nanoemulsão aos tecidos em alta divisão celular, independente das lipoproteínas séricas. Estes resultados abrem caminho para novos estudos de avaliação da nanotecnologia como opção terapêutica às cirurgias radicais, com menores complicações e sem efeitos colaterais sistêmicos.

DESCRITORES: endometriose; receptores de LDL; nanotecnologia; colesterol; nanopartícula; lipoproteínas; terapêutica

ABSTRACT

Bedin AAS. **Uptake of radiolabeled lipid nanoparticle by LDL receptors on the cell membrane of endometriosis foci** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Between 5.3% and 12% of women with endometriosis present the most severe form of disease, with deep intestinal involvement, mainly treated by surgery, which has a high rate of complications: recurrence of lesions, fistulas, hemorrhage, infection, intestinal subocclusion and bladder and / or bowel dysfunction. Drug treatment aims to inhibit foci growth by means of ovarian blockage, with good reduction of pain, but with no effect on endometriotic nodules, and frequent side effects due to the long duration of treatment. Currently, drugs can be coupled to nanoparticles that have affinity with compromised tissues, in order to be delivered directly to them, without significant systemic effects and with superior efficacy in the control of lesions. There are evidences that cells in high division have higher uptake of LDL than normal cells, for membrane synthesis. In several types of cancer, rheumatic diseases, atherosclerosis, multiple myeloma and in diabetic cardiomyopathy, the significantly greater need for LDL allowed good therapeutic results by coupling a chemotherapeutic to LDE (an artificial nanoemulsion similar to LDL that binds to the same receptor). In endometriosis, as well as in cancer, there are growth factors and cytokines associated with cell multiplication, and there is also overexpression of LDL receptors in endometriosis lesions. In addition, women with intestinal endometriosis have higher plasma LDL levels than healthy ones. This study evaluated the uptake of radioactively labeled LDE emulsion by receptors on the surface of endometriotic foci, to later test the LDE capacity of cellular interiorization. It was a comparative pilot study between three groups: patients with intestinal and non-intestinal endometriosis, and without endometriosis. Before surgical treatment, the lipid profile of patients was determined and labeled LDE nanoemulsion was injected. The radioactivity of the collected tissue samples (intestinal and non-intestinal endometriosis, healthy peritoneum and topical endometrium) was measured. In the comparison between groups, there was no significant difference in parameters ($p > 0.01$), possibly due to the small sample. But the group with intestinal endometriosis tended to present a lower BMI than others, with greater pain symptomatology and higher levels of LDL. LDE uptake in healthy

peritoneum was higher in the non-intestinal endometriosis group. The topical endometrium and foci of intestinal endometriosis uptaked more LDE than non-intestinal ones, suggesting greater cell division and less fibrosis. Comparison of LDE uptake per site showed a tendency toward decreasing uptake between topical endometrium, healthy peritoneum and endometriosis lesion. As endometriosis foci (intestinal or not) have uptaked LDE on a significant level, the conclusion might be that there is an increased consumption of LDL by endometriosis lesions, as well as in cancer and inflammatory diseases. There was no difference between plasma cholesterol levels and LDE uptake, demonstrating the direct delivery of the nanoemulsion to tissues in high cell division, independent of serum lipoproteins. These results open the way for new studies evaluating nanotechnology as a therapeutic option for radical surgeries, with lower complications and no systemic side effects.

DESCRIPTORS: endometriosis; LDL receptors; nanotechnology; cholesterol; nanoparticles; lipoproteins; therapeutics

Figura

Figura 1 Valores de captação da nanopartícula lipídica marcada (LDE), divididos por grupos (Controle, Endometriose Intestinal e Endometriose Não Intestinal) e em cada grupo, por local avaliado (Peritônio, Endométrio Tópico e Endometriose)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros clínicos expostos em média e desvio padrão dos diferentes grupos: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Tabela 2. Quadro clínico de pacientes dos diferentes grupos: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Tabela 3. Resultados das concentrações de colesterol total e suas frações e de triglicérides em mg/dl (expostos em média e desvio padrão) realizados nos três grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Tabela 4. Captação da emulsão nanolipídica marcada nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio), exposta em média e desvio padrão, segundo grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal) e resultados dos testes comparativos.

Tabela 5. Captação da emulsão nanolipídica marcada, exposta em média e desvio padrão, segundo grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal), nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio) e resultados dos testes comparativos.

Tabela 6. Valores de correlações entre a nanopartícula encontrada nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio) e as concentrações de colesterol total e suas frações e de triglicérides nas pacientes com endometriose.

Lista de Abreviaturas

ApoB 100	Apolipoproteína B 100
ApoE	Apolipoproteína E
CT	Colesterol Total
GnRH	<i>Gonadotrophins Releasing Hormone</i> , Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HC-FMUSP	Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> , Lipoproteína de Alta Densidade
LDE	Nanopartícula Lipídica
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> , Lipoproteína de Baixa Densidade
TGL	Triglicérides
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> , Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

Sumário

1. Introdução	15
1.1. Endometriose	16
1.2. Participação do colesterol nas doenças neoplásicas	18
1.3. A nanotecnologia em Medicina	19
1.4. Endometriose, câncer e drogas anti proliferativas	20
1.5. Hipótese do Estudo	21
2. Objetivo	22
3. Métodos	24
3.1. Local de estudo e pacientes	25
3.2. Cálculo da Amostra	25
3.3. Critérios de inclusão	26
3.4. Quadro Clínico	26
3.5. Dinâmica do Estudo	27
3.6. Dosagem de Triglicérides e Colesterol	28
3.7. Preparação da Nanopartícula	29
3.7.1. Determinação da captação da LDE	29
3.7.2. Segurança Radiológica	30
3.8. Análise estatística	32
4. Resultados	33
5. Discussão	41
6. Conclusão	49
7. Referências Bibliográficas	51

8. Anexos	67
Anexo 1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP.	68
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes com Endometriose	70
Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes sem Endometriose (Grupo Controle)	74
Anexo 4. Tabela Completa de resultados por paciente: idade, parâmetros clínicos e laboratoriais	78
Anexo 5. Tabela Completa de resultados por paciente: peso do tecido coletado, captação da nanopartícula (LDE) bruta e captação calculada (ajustada para 1g de tecido)	79

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Endometriose

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 (Cornillie et al., 1990). As lesões com profundidade acima de 5 mm situadas em fundo de saco de Douglas, reflexão vesicouterina e outros locais da pelve, representam o tipo de doença onde as pacientes apresentam mais queixas clínicas e com eventual necessidade de cirurgias mais complexas (Cornillie et al., 1990).

A endometriose representa afecção ginecológica de alta morbidade. Sabe-se que acomete cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva e pode promover sintomatologia algica muitas vezes incapacitante, assim como ser causa de infertilidade feminina, havendo, por vezes, indicação de tratamento cirúrgico como principal estratégia terapêutica (Redwine et al., 1992; Triolo et al., 2013; Cao et al., 2015; Darwish & Roman, 2016; Lagana et al., 2016). Estimam-se que 5,3 a 12% das mulheres com endometriose apresentam a forma mais severa da doença com comprometimento profundo do intestino, o que pode tornar o tratamento cirúrgico complexo, levando a eventual persistência dos focos, além das possibilidades de recorrência das lesões (Konickx et al., 1991; Chapron et al., 2003; De Cicco et al., 2010; Kondo et al., 2011; Nezhat et al., 2011; Abrao et al., 2015; Magrina et al., 2015; Rausei et al., 2015; Lagana et al., 2016) e alteração na qualidade de vida (Bassi et al., 2011; Mabrouk et al., 2011; Simoens et al., 2012; Ribeiro et al., 2014; Selvi Dogan et al., 2016; Giussey et al., 2017).

A taxa de complicações após cirurgia laparoscópica na endometriose profunda é estimada em 3,4%, elevando-se até a 10 a 22% quando é necessária a ressecção intestinal segmentar (Armengol-Debeir et al., 2011; Kondo et al., 2011; English et al., 2014; Rausei, 2015 et al.; Seracchioli et al., 2015). O envolvimento ureteral, apesar de considerado raro, chega a uma frequência estimada de 10-14% dos casos quando há nódulos retrocervicais maiores que 3 cm e pode, eventualmente, levar a perda de função renal assintomática (Munoz et al., 2012).

Embora seja considerada doença benigna, a endometriose possui características típicas de doença neoplásica, como a capacidade de invasão em estruturas adjacentes e

associação com lesões à distância (Stern et al., 2001). Como o câncer, a endometriose pode aderir a outros tecidos, invadi-los e deformá-los (Abrão et al., 2006), apesar de não estar demonstrado estado de alto consumo metabólico (Thomas et al., 2000). 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 (Thomas et al., 2000; Stern et al. 2001; Podgaec et al., 2007; Machado et al., 2008; Olovsson, 2011). Na endometriose, doença de características inflamatórias, ocorre relativo aumento de citocinas representativas de padrão de resposta imune humoral (Podgaec et al., 2007; Olovsson, 2011; Podgaec et al., 2012; Bellelis et al., 2013; Chaudhury et al., 2013; Salmeri et al., 2015; Sofo et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que o fator de crescimento endotelial vascular evolui com variações cíclicas no fluido peritoneal (Pupo-Nogueira et al., 2007). Assim como seu receptor, a distribuição e a densidade vascular estão significativamente mais altos em pacientes com endometriose profunda envolvendo o reto (Machado et al., 2008).

Outra característica importante da endometriose é a composição histopatológica dos nódulos endometrióticos profundos, que se diferenciam dos implantes peritoneais e ovarianos, já que contêm uma alta proporção de tecido fibro-conectivo (41%) e fibras musculares lisas (35%), quando comparados com o endométrio (24%) (Roman et al., 2011).

Considerando-se que a endometriose é uma doença estrogênio-dependente (Giudice, 2010), o tratamento medicamentoso atualmente disponível visa inibir o crescimento dos focos por meio da interrupção da atividade ovariana (com os análogos do GnRH) ou através de pílulas anticoncepcionais, que têm demonstrado boa atuação na redução de sintomas (Seracchioli et al., 2010). Novas modalidades terapêuticas vêm sendo testadas com o objetivo de redução dos focos e da sintomatologia da endometriose, como dispositivos intrauterinos liberadores de levonorgestrel, inibidores da aromatase, antagonistas do GnRH, moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (SERMs) e progestagênicos (SPRM), inibidores da angiogênese e imunomoduladores, entre outros (Elnashar, 2015).

Entretanto, tais medidas eventualmente melhoram a sintomatologia álgica, mas não promovem diminuição dos nódulos endometrióticos (Roman et al., 2011). Por ser doença crônica e requerer tratamento de longa duração, a terapêutica clínica

antiestrogênica ainda enfrenta limitações pelos potenciais efeitos colaterais, como sintomas climatéricos e diminuição da densidade mineral óssea, além de não proporcionar o desaparecimento definitivo dos focos e não beneficiar pacientes com história de infertilidade (Elnashar, 2015).

Como consequência destes resultados insatisfatórios no controle clínico da endometriose, modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos com nanopartículas para entrega direcionada de drogas, diretamente nas lesões de endometriose, com resultados promissores em relação a menores efeitos colaterais sistêmicos e diminuição das lesões (Chaudhury et al., 2013; Singh et al., 2015; de Almeida Borges et al., 2016).

1.2 Participação do colesterol nas doenças neoplásicas

Vários autores têm publicado evidências de que células tumorais apresentam maior captação de LDL quando comparados às células normais (Ho et al., 1978; Vitols et al., 1992; Maranhao et al., 1992; Maranhao et al., 1994; Guo et al., 2011; Liu et al., 2013). A LDL é o maior transportador de colesterol do organismo, representando cerca de 70% do total de colesterol plasmático (Vitols et al., 1992; Gabitova et al., 2013). Alguns tumores sólidos, principalmente os de proliferação rápida, apresentam maior consumo e, conseqüentemente, maior necessidade de colesterol (Vitols et al., 1992; Rudling et al., 1990; Lepalla et al., 1995; Kitahara et al., 2011; Llaverias et al., 2011; Silvente-Poirot & Poirot, 2014; Touvier et al., 2015). A explicação deste fenômeno é a necessidade aumentada de colesterol da célula tumoral para síntese de membrana no crescimento e divisão celular (Gabitova et al., 2013).

Em 1978, Ho et al associaram a leucemia com a hipocolesterolemia sérica. Demonstraram que células leucêmicas tinham atividade de receptores para LDL três a 100 vezes maior do que leucócitos normais. Outros estudos posteriores corroboraram a relação entre câncer e baixos níveis plasmáticos de colesterol (Pinheiro et al., 2006; Kok et al., 2011; Simko, 2014). Este foi o principal impulso para o estudo da LDL como veículo de transporte específico de drogas antineoplásicas, participando da revolução do uso da nanotecnologia em diversos setores da Medicina.

1.3 A nanotecnologia em Medicina

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). Atualmente este recurso tem sido empregado em diversas doenças como câncer, diabetes, infecções fúngicas, virais e terapia genética (Bayford, 2017). Além disso, limitam os efeitos colaterais e previnem o desenvolvimento de resistência farmacológica (Bayford, 2017).

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; Versluis et al., 1996).

A LDL é uma partícula esférica com peso molecular de 3×10^6 d e diâmetro de 22 nm, que contém em seu núcleo cerca de 1500 moléculas de ésteres de colesterol envoltas por uma proteína, a apolipoproteína B (apoB100), responsável pelo reconhecimento da estrutura pelo receptor de membrana específico (Vallabhajosula et al., 1990).

O uso da molécula de LDL natural obtida do plasma, no entanto, mostrou-se muito dispendioso. O processo de isolamento a partir do sangue é muito 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 (Maranhao et al., 1992).

A emulsão lipídica denominada LDE assemelha-se estruturalmente com a porção lipídica da LDL original, porém não possui apoB100. Em contato com o plasma, a LDE adquire a apoE, proteína presente na HDL, VLDL e quilomícrons. A ApoE, como outras apolipoproteínas móveis, migra das lipoproteínas originais para as partículas de LDE. Como a ApoE também pode ser reconhecida pelos receptores de LDL, permite que a LDE seja interiorizada pelas células pela mesma trajetória da LDL (Ginsburg et al., 1982; Maranhao et al., 1993; Wilson et al., 1991).

Uma maneira de verificar esta interiorização da LDE é a marcação da mesma com ^{14}C , dosando sua captação pelas células dos diversos tecidos (Maranhao et al., 1993). Outros estudos avaliaram a distribuição plasmática da LDE radiomarcada após

injeção intravenosa, sua ligação com os receptores de LDL e posterior absorção celular, confirmando ter ela a mesma afinidade que a LDL com os receptores de membrana (Maranhao et al, 1993; Maranhao et al, 1994; Graziani et al, 2002).

Em 2001, foi avaliada a interiorização *in vitro* do complexo LDE/Daunorrubicina por células de Leucemia Mielóide Aguda (Dorlhiac-Llacer, 2001). Este estudo evidenciou alta afinidade da LDE pelos receptores de LDL superexpressos na membrana celular dos blastócitos, boa capacidade de destruição celular pela droga, evidenciando que o complexo droga/nanocarreador não influenciou na citotoxicidade da Daunorrubicina. Também se observou proteção efetiva das células sadias dos efeitos tóxicos da droga livre (Dorlhiac-Llacer, 2001).

Desde então, Maranhao et al. têm demonstrado a capacidade de acoplamento de drogas como Daunorrubicina, Paclitaxel, Carmustina e Etoposide na LDE e a possibilidade de utilização em doenças como Mieloma Múltiplo, Cardiomiopatia Diabética, Câncer de Ovário, Câncer de Mama, Linfoma Hodgkin e Não-Hodgkin, Melanoma e Aterosclerose (Rodrigues et al., 2002; Maranhao et al., 2002; Azevedo et al., 2005; Pinheiro et al., 2006; Maranhao et al., 2008; Pires et al., 2009; Graziani et al., 2017; Lima et al., 2017; Maranhao et al., 2017).

1.4 Endometriose, câncer e drogas anti proliferativas

Considerando-se que na endometriose os mecanismos de crescimento e invasão têm pontos coincidentes com o comportamento das neoplasias, acredita-se que a endometriose possa ter correlação fisiopatológica com as lesões tumorais (Stern et al., 2001; Abrao et al., 2006). Recentemente, observou-se que as mulheres com endometriose intestinal apresentam níveis plasmáticos de LDL mais baixos que o grupo sem a doença (Gibran et al, 2017), característica comparável aos resultados de alguns tipos de câncer (Kitahara et al, 2011; Kok et al, 2011; Llaverias et al, 2011; Silvente-Poirot & Poirot, 2014; Simko, 2014).

Nesse mesmo estudo, Gibran et al (2017) avaliaram a expressão de receptores de LDL na membrana celular das lesões de endometriose. Observaram superexpressão dos receptores de LDL nas lesões de endometriose, comparativamente ao endométrio tópico, sugerindo a necessidade aumentada de LDL para formação de membrana celular das células em divisão. Este é o mesmo princípio do câncer, onde também há aumento

nos receptores da LDL, para interiorização da mesma pela célula e posterior formação de membranas celulares na divisão mitótica aumentada. Este estudo (Gibran et al, 2017) foi a primeira etapa do modelo racional para avaliação do tratamento da endometriose através da nanotecnologia.

1.5 Hipótese do Estudo

Assim, tendo sido observada a superexpressão dos receptores de LDL pelas células de endometriose, foi dada sequência nesse modelo, através do presente projeto de pesquisa com o objetivo de avaliar a captação da emulsão de LDE marcada radioativamente pelos receptores na superfície do foco endometriótico. A hipótese do estudo é de haver captação da emulsão de LDE marcada pelos receptores do foco endometriótico, e, a partir dos resultados obtidos com esta avaliação, será possível testar a capacidade da LDE de interiorização celular e, com isso, selecionar uma droga para acoplamento nesta emulsão lipídica que seja capaz de destruir o foco endometriótico sem, no entanto, causar danos ao tecido sadio adjacente, nem apresentar efeitos colaterais e complicações características dos procedimentos cirúrgicos.

2. Objetivo

2. Objetivo

Avaliação da captação da nanopartícula lipídica de LDL marcada com ^{14}C pelo tecido endometriótico de pacientes com endometriose ovariana e profunda, pelo peritônio sadio adjacente às lesões e pelo endométrio, relacionando tal captação com os locais de acometimento da endometriose;

3. Métodos

3. Métodos

3.1. Local de estudo e pacientes

O presente estudo caso-controle prospectivo exploratório foi realizado na Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), onde as pacientes foram divididas em dois grupos: grupo A, formado de pacientes com endometriose e grupo B, formado de pacientes sem endometriose. O estudo foi aprovado pela Comissão de análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (Aprovação número 435.641), as pacientes foram previamente informadas sobre o conteúdo da pesquisa e o material só foi coletado após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 2 e 3). A coleta das amostras respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pela CAPPesq da instituição, bem como os protocolos técnicos do hospital e dos médicos envolvidos.

3.2 Cálculo da amostra

Visando encontrar diferença na presença do marcador em pacientes com endometriose ovariana e profunda, além do endométrio tópico e do peritônio sadio em relação a mulheres do grupo controle, supondo que cada grupo foi considerado um estudo de incidência específico e como não se conhece nada a respeito do marcador nesses grupos, foi considerada amostra conservadora, onde em 50% dos casos seria encontrado o marcador com precisão (erro) de 5% (Kirkwood e Sterne, 2006). Usando a fórmula abaixo, a amostra de pacientes necessária em cada grupo seria de 384 mulheres.

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{(\text{erro})^2}$$

Onde: $Z_{\alpha/2}$ é o valor da distribuição normal padrão com nível de significância $\alpha/2$; erro é a imprecisão desejada para a incidência da presença do marcador; p é a estimativa da incidência do marcador em cada local.

Considerando-se o grande número de pacientes necessário sugerido pelo cálculo amostral, não sendo então possível alcançar o n calculado, optou-se pela realização de estudo piloto neste modelo. Assim, trata-se de estudo caso-controle prospectivo exploratório, onde foram incluídas pacientes submetidas a tratamento cirúrgico da endometriose e laqueadura tubárea em período de 6 meses, resultando em 14 pacientes com endometriose (grupo A) e 3 pacientes sem a doença (grupo B).

3.3 Critérios de inclusão

Determinou-se para o grupo A os seguintes critérios de inclusão:

- Idade entre 18 e 45 anos;
- Endometriose ovariana ou profunda comprovadas histologicamente;
- Ciclos menstruais eumenorréicos, com o intervalo entre os ciclos variando de 26 a 34 dias;
- Não utilização de terapêutica hormonal nos três meses que antecederam a cirurgia, incluindo análogos de GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais orais.

Para o grupo B, foram selecionadas mulheres respeitando os mesmos critérios do grupo A, com exceção da confirmação histológica de endometriose.

3.4 Quadro Clínico

Todas as pacientes foram questionadas quanto aos seis sintomas mais frequentemente relacionados à endometriose:

1. Dismenorréia – dor em cólica durante o período menstrual
2. Dispareunia de profundidade – dor pélvica durante o ato sexual
3. Dor pélvica acíclica – dor pélvica sem relação com o período menstrual, constante, sem melhora com o uso de analgésicos

4. Infertilidade – dificuldade para um casal engravidar, sem o uso de métodos contraceptivos, por pelo menos um ano de tentativa com vida sexual ativa (duas ou mais relações por semana)
5. Alteração intestinal cíclica – dor e/ou sangramento à evacuação no período menstrual
6. Alteração urinária cíclica – dor e/ou sangramento à micção no período menstrual

Todos os quadros álgicos tiveram sua intensidade avaliada de acordo com uma escala analógica de dor que varia de 0 a 10.

3.5. Dinâmica do Estudo

Todas as pacientes foram avaliadas do ponto de vista clínico pela anamnese, exame físico e de imagem (ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética, quando apropriado), sendo incluídas nesse estudo, para o grupo A (com endometriose), aquelas com indicação de videolaparoscopia por suspeita de endometriose. Os critérios para indicação de videolaparoscopia para a endometriose foram: suspeita de acometimento ureteral obstrutivo; intestinal (íleo terminal, apêndice e/ou retossigmoide, com sinais de sub-oclusão), endometriomas ovarianos acima de 6,0 cm e/ou pacientes sem melhora clínica (dor pélvica) após 12 meses de tratamento clínico hormonal.

O grupo B (sem endometriose) foi composto de pacientes submetidas a laqueadura tubária, de acordo com indicação apropriada do Setor de Planejamento Familiar da Clínica Ginecológica do HC-FMUSP. Para inclusão nesse grupo, a paciente não apresentava endometriose, nem outras doenças ginecológicas, comprovando-se com exames de imagem e durante o procedimento cirúrgico.

Antes do tratamento cirúrgico, foi determinado o perfil lipídico das pacientes dos dois grupos, em amostras de soro obtidas após jejum de 12 horas.

No dia anterior à cirurgia, 0,1 ml da nanopartícula lipídica sólida (LDE) marcada radioativamente com [14C]-oleato de colesterol foram injetados por via intravenosa em cada paciente de ambos os grupos.

No dia da cirurgia foi anotado o dia do ciclo menstrual, sendo considerado como fase folicular do primeiro ao décimo quarto dia do ciclo e fase lútea do décimo quinto

até o último dia do ciclo menstrual. Após os procedimentos anestésicos e o posicionamento da paciente, foi coletada amostra de endométrio tópico com auxílio de cureta de Pipelle.

No grupo A, as pacientes foram submetidas a videolaparoscopia para confirmação diagnóstica, ressecção das lesões acometidas e obtenção de amostra de tecido peritoneal sadio adjacente a uma das lesões de endometriose. Foram anotados os locais de acometimento das lesões, dividindo-se em ovário, região retrocervical, vagina, bexiga e retossigmóide. Na avaliação dos resultados, os grupos de acometimento foram classificados em intestinal e não-intestinal. No grupo B, as pacientes foram submetidas a videolaparoscopia para realização da laqueadura tubária e foi coletada amostra de peritônio sadio.

Com a realização do procedimento cirúrgico proposto, o patologista e o cirurgião, que acompanharam todos os procedimentos, selecionaram amostras de tecido endometriótico e de peritônio sadio, por meio de análise macroscópica do espécime cirúrgico. Esse mesmo patologista realizou dateamento do endométrio tópico para comprovar a fase do ciclo em que a paciente se encontrava. O tecido endometrial tópico, o foco de endometriose e o fragmento de peritônio sadio adjacente foram divididos em duas partes e encaminhados separadamente, sendo uma parte para o Departamento de Patologia do HCFMUSP, onde realizou-se a análise histopatológica, e a outra encaminhada para análise de radioatividade no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da FMUSP. Da mesma maneira, as amostras de tecido endometrial tópico e fragmento de peritônio das pacientes do grupo B (sem endometriose) foram divididas em duas partes e encaminhadas para datação do endométrio e para análise de radioatividade.

3.6 Dosagem de triglicérides e colesterol

Os triglicérides e o colesterol total foram determinados pelo método colorimétrico-enzimático, utilizando-se os kits comerciais (Labtest, São Paulo, Brasil). A concentração de HDL foi medida pelo mesmo método, após precipitação da LDL e

LDL. A concentração de LDL foi calculada pela fórmula de Friedewald et al (1972):
 $LDL = \text{Colesterol Total} - (\text{VLDL} + \text{HDL})$ e a de VLDL pela fórmula $VLDL = TGL/5$.

3.7 Preparação da Nanopartícula

A nanopartícula lipídica (LDE) foi preparada segundo a técnica modificada por Maranhao et al. (1993): em um frasco, foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio:metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^{14}C -colesterol esterificado e ^3H -colesterol livre. Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo por 16 h, a 4°C. Após a adição de 10 ml de tampão tris-HCL 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultrassônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultrassom, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55 °C. Para obtenção da LDE na faixa de diâmetro e tamanho desejado, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW-41).

Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos a 4°C, foi removido por aspiração (1mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr), ajustando a densidade para 1,21 g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a LDE foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra duas trocas de 1000 volumes tampão tris-HCL 0,01M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore (0,22 μ de porosidade), sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até trinta dias.

3.7.1 Determinação da captação da LDE

Os lípidos foram extraídos das amostras de tecidos coletados seguindo o método convencional descrito por Folch et al. (1957). Os fragmentos foram limpos em condições adequadas sob placa de gelo, em seguida pesados e então macerados de forma a ficarem com o aspecto pastoso. Os fragmentos foram transferidos para tubos grandes (20x160), onde foram adicionados 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio.

As amostras ficaram em repouso “*overnight*” a 4 °C. Depois, por duas vezes foram filtradas, lavadas com 2,5 mL de clorofórmio e adicionados 7 mL de água bidestilada. A fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e descartada. Foram adicionados 4 mL de “Clear Folch” (CHCl₃/ MEOH/ H₂O, na proporção de 3:48:47), a amostra ficou mais uma vez em repouso “*overnight*” à temperatura ambiente, e novamente o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio (N₂), dissolvidas em solução de Folch, transferidas para tubos menores lavando-se várias vezes, e foram, mais uma vez, secas sob fluxo de nitrogênio e reconstituídas em 500 µL de solução de Folch em gelo.

Os componentes marcados da LDE foram separados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de silicagel 60H (Sigma S-6628), onde foram aplicados 100 µL de amostra. Hexano/éter etílico/ácido acético, na proporção 70:30:1, foram utilizados como fase móvel. As placas foram reveladas com iodo sublimado, demonstrando as áreas das bandas referentes às frações lipídicas. As faixas correspondentes às bandas de interesse foram removidas para frascos de cintilação, foram adicionados 4 mL de solução cintiladora, e a radioatividade foi medida com um espectrômetro de cintilação líquida (Packard 1600 TR, Palo Alto, CA).

3.7.2 Segurança Radiológica

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas da "International Commission on Radiological Protection" (ICRP) (Paquet et al., 2016). O parâmetro "Annual Limit for Intake" (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 50 mSv. Para componentes orgânicos marcados com ¹⁴C ou ³H, os valores de ALI são 9 x 10⁷ e 3 x 10⁹ Bq, respectivamente. No presente estudo, a dose injetada de ¹⁴C foi de 22,2x10⁴ Bq, o que equivale a: $(22,2 \times 10^4 \text{ Bq} / 9 \times 10^7 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,1233 \text{ mSv}$. Para o ³H, a dose injetada foi de 44,4 x 10⁴ Bq, portanto a dose equivalente: $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$. A dose equivalente incorporada no corpo inteiro, em consequência da exposição aos lípides radioativos, foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry (Smith et al., 1977). Os dados descritos para ratos pesando 0,4 kg foram ajustados para

seres humanos, estimando-se um peso médio de 70 kg, utilizando-se um fator de correção com a seguinte equação:

$$KHomen = kRato \times (70kg / 0,4kg)^{1-x}$$

O valor exponencial X representa uma escala de variações interespecies da farmacocinética, levando em consideração o tempo biológico de cada espécie, que varia de 0,65 a 0,95. Considerando o valor de X=0,86, estima-se para os seres humanos, um nível plasmático total de 204 mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250 mg/dia (Boxenbaum, Ronfeld, 1983). Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros, em seres humanos (Maranhao & Quintao, 1983).

O método acima descrito permite estimar que os participantes deste estudo receberam por dose injetada de ¹⁴C oleato de colesterol, 0,26 mGy no intestino grosso inferior, 0,5 mGy no intestino grosso superior, 0,18 mGy na pele, 0,13 mGy na superfície dos ossos e 0,13 mGy no fígado. A dose recebida pelos pulmões, coração, ovários ou testículo é desprezível. A dose-equivalente incorporada no corpo inteiro, em consequência à exposição aos lípides radioativos, foi estimada em 0,02 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD (Medical International Radiological Dosimetry) (Maranhao et al., 1994). A dose máxima de exposição à radioatividade para o público geral (não-ocupacional), segundo as diretrizes de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEM – Brasil, 2011), é de 5 mSv ao ano (CNEM, 2011).

Comparativamente, uma radiografia de tórax equivale a 0,1 mSv de dose-equivalente incorporada; uma tomografia computadorizada de corpo inteiro, a 11 mSv; e uma viagem aérea de 10 horas, a 0,05 mSv.

Desta forma, os estudos anteriores foram eticamente aprovados, incluindo nos mesmos o uso da nanopartícula em controles saudáveis, já que a biossegurança da nanopartícula está comprovada, tanto em portadores das doenças / neoplasias – grupo alvo, quanto em grupos-controle saudáveis (Maranhao et al., 1994; Maranhao et al., 1996; Ades et al., 2001; Graziani et al., 2002; Paquet et al., 2016) e, desta forma, o risco de efeito radioativo lesivo é desprezível.

3.8 Análise estatística

As características pessoais e exames avaliados foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana e quartis) e comparadas entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis (Kirkwood e Sterne, 2006).

A quantidade da emulsão injetada encontrada nos locais de interesse padronizadas para 1g foram descritas segundo grupos e comparadas entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis e entre os locais para cada grupo com uso de testes de Friedman ou teste de Wilcoxon pareado (Kirkwood e Sterne, 2006), para essas comparações o nível de significância adotado foi de 1% para corrigir as múltiplas comparações realizadas.

Foram calculadas as correlações de Spearman (Kirkwood e Sterne, 2006) entre os exames laboratoriais e a quantidade de fluído encontrada nos locais de interesse apenas para as mulheres com endometriose para verificar se migração de substância para esses locais sofre influência dos níveis dos exames laboratoriais.

Foram empregados apenas testes não paramétricos devido ao pequeno número de amostras em cada grupo e com isso não assumir qualquer suposição sobre os dados avaliados. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4. Resultados

Foram avaliados os resultados de 17 pacientes, sendo 3 do grupo controle (laqueadura tubária, sem endometriose) e 14 do grupo endometriose. Destas pacientes, 6 apresentavam endometriose intestinal e 8 não eram portadoras de lesões intestinais, sendo que uma paciente apresentava lesão retrocervical, uma endometrioma ovariano, quatro tinham lesões retrocervicais e endometriomas ovarianos e duas apresentavam lesões retrocervicais e de bexiga. Na Tabela 1, observa-se que a média de idade foi pouco superior nos grupos Endometriose Intestinal e Não intestinal (36 e 39,6 anos respectivamente, $p=0,136$) em relação ao grupo sem a doença, sem diferença estatisticamente significativa. De forma similar, não houve diferença significativa no índice de massa corpórea entre os diferentes grupos ($p=0,730$). Em relação à fase do ciclo menstrual, 3 pacientes do grupo endometriose intestinal, 5 do não-intestinal e 2 do grupo controle encontravam-se na fase folicular. Em duas pacientes, não foi possível a determinação da fase do ciclo.

Tabela 1. Parâmetros clínicos expostos em média e desvio padrão dos diferentes grupos: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Variável	Grupo			p
	Controle (n = 3)	Intestinal (n = 6)	Não intestinal (n = 8)	
Idade (anos)	30,3 ± 2,9	36 ± 9,4	39,6 ± 5,8	0,136
Peso (Kg)	75,1 ± 25	67,8 ± 12,2	74,5 ± 14,7	0,788
Índice de Massa				
Corpórea (Kg/m ²)	28,8 ± 7,0	27,3 ± 4,2	28,8 ± 3,7	0,730

Teste Kruskal-Wallis

Na Tabela 2 são descritos os percentuais de pacientes em cada grupo que apresentavam os sintomas sugestivos de endometriose.

Tabela 2. Quadro clínico de pacientes dos diferentes grupos: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Variável	Grupo		
	Controle	Intestinal	Não intestinal
	(n = 3)	(n = 6)	(n = 8)
	%	n (%)	n (%)
Dismenorréia	0	5 (87,5)	5 (62,5)
Dispareunia de profundidade	0	5 (87,5)	8 (100,0)
Dor pélvica crônica	0	4 (66,7)	5 (62,5)
Infertilidade	0	3 (50,0)	4 (50,0)
Alteração intestinal			
cíclica	0	4 (66,7)	2 (25,0)
Alteração urinária			
cíclica	0	1 (16,7)	4 (50,0)

Na Tabela 3, são apresentados os parâmetros laboratoriais avaliados no estudo. O grupo Endometriose não intestinal mostrou tendência a ter colesterol total (CT), LDL colesterol e Triglicérides (TGL) mais baixos. Não houve diferença estatística na comparação realizada entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 3. Resultados das concentrações de colesterol total e suas frações e de triglicérides em mg/dL (expostos em média e desvio padrão) realizados nos três grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal).

Variável (mg/dL)	Grupo			P
	Controle	Intestinal	Não intestinal	
	(n = 3)	(n = 6)	(n = 8)	
CT	226 ± 49	198 ± 35	154 ± 53	0,26
HDL	45 ± 14	47 ± 3	46 ± 15	0,83
LDL	112 ± 26	121 ± 24	87 ± 40	0,21
TGL	115 ± 20	155 ± 59	107 ± 40	0,29

Teste Kruskal-Wallis / mg/dL- miligrama por decilitro

Na Tabela 4 pode ser observada a comparação da captação da nanopartícula nos diferentes tecidos entre os grupos (controle, endometriose intestinal e endometriose não-intestinal). Na análise estatística destes valores não houve diferença significativa da quantidade de nanopartícula captada entre os grupos ($p > 0,01$).

Tabela 4. Captação da emulsão nanolipídica marcada nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio), exposta em média e desvio padrão, segundo grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal) e resultados dos testes comparativos.

Variável (cpm/g)	Grupo			p*
	Controle (N = 3)	Intestinal (N = 6)	Não intestinal (N = 8)	
Peritônio	665 (739,9)	316,7 (511,9)	712,3 (1069,1)	0,538
Endometriose	--	180,8 (169,8)	197,5 (403,5)	0,651
Endométrio	1152,3 (1332,2)	1340,4 (2220,4)	709,9 (1275,5)	0,941

* Teste Kruskal-Wallis. Em razão da múltiplas comparações os testes devem ser analisados com nível de significância de 1% ($\alpha = 0,01$). Cpm/g (contagem radioativa/grama de tecido)

Na Tabela 5, cada grupo foi avaliado separadamente, comparando-se o endométrio tópico e os tecidos endometrióticos intestinal e não intestinal. Os tecidos endometrióticos captaram a nanopartícula de maneira semelhante. Ainda que não significante estatisticamente, a captação foi maior no endométrio, seguido pelo peritônio e, por último, pelo tecido endometriótico ($p > 0,01$). Da Tabela 5, extraiu-se a Figura 1, para melhor visualização.

Tabela 5. Captação da emulsão nanolipídica marcada, exposta em média e desvio padrão, segundo grupos de pacientes: sem endometriose, com endometriose intestinal e com endometriose em outros locais (não intestinal), nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio) e resultados dos testes comparativos.

Grupo	Variavel (cpm/g)			p*
	Peritonio Media±DP	Endometriose Media±DP	Endometrio Media±DP	
Controle (N=3)	665±739,9	---	1152,3 ± 1332,2	0,655#
Intestinal (N=6)	316,7 ± 511,9	180,8 ± 169,8	1340,4 ± 2220,4	0,449
Não Intestinal (N=8)	712,3 ± 1069,1	197,5 ± 403,5	709,9 ± 1275,5	0,156

* Teste de Friedman; # Teste Wilcoxon pareado. Em razão da múltiplas comparações os testes devem ser analisados com nível de significância de 1% ($\alpha = 0,01$) / DP = desvio padrão / Cpm/g (contagem radioativa/grama de tecido)

Figura 1. Valores de captação da nanopartícula lipídica marcada (LDE), divididos por grupos (Controle, Endometriose Intestinal e Endometriose Não Intestinal) e em cada grupo, por local avaliado (Peritônio, Endométrio Tópico e Endometriose)

*=valores fora da curva (*outliers*)

Foram calculadas as correlações de Spearman (Kirkwood e Sterne, 2006) entre os exames laboratoriais e a quantidade de fluido encontrada nos locais de interesse apenas para as mulheres com endometriose para verificar se migração de substância para esses locais sofre influência dos níveis dos exames laboratoriais.

Comparando-se a captação da nanopartícula nos diferentes sítios avaliados, com os resultados dos exames laboratoriais das pacientes com endometriose (Tabela 6 – valor r), não houve diferença estatisticamente significante entre os parâmetros (Tabela 6 - $p > 0,05$).

Tabela 6. Valores de correlações entre a nanopartícula encontrada nos locais de interesse (Peritônio, Lesão de Endometriose e Endométrio) e as concentrações de colesterol total e suas frações e de triglicérides nas pacientes com endometriose.

	Correlação	Peritônio	Endometriose	Endométrio
CT	r	0,321	0,333	0,286
	p	0,365	0,347	0,493
	n	10	10	8
HDL	r	0,201	0,237	0,143
	p	0,578	0,510	0,736
	n	10	10	8
LDL	r	0,261	0,176	0,143
	p	0,467	0,627	0,736
	n	10	10	8
TGL	r	-0,261	-0,188	-0,405
	p	0,467	0,603	0,320
	n	10	10	8

Correlação de Spearman

r=relação captação com parâmetro sérico; p=índice p; n=número de pacientes

5. Discussão

5. Discussão

A endometriose, doença que chega a acometer 10% das mulheres em idade reprodutiva, pode apresentar-se de forma muitas vezes bastante agressiva, especialmente ao comprometer o funcionamento de órgãos vitais, como o intestino e as vias urinárias (Cornillie et al., 1990). Além da sintomatologia álgica, muitas vezes incapacitante, a endometriose pode cursar também com obstrução intestinal, perda de função renal e infertilidade, entre outras complicações (Redwine et al., 1992; Triolo et al., 2013; Cao et al., 2015; Darwish & Roman, 2016; Lagana et al., 2016). Por esta razão, seus mecanismos inflamatórios, de invasão e expansão vêm sendo estudados, como tentativa de controle de suas consequências (Thomas et al., 2000; Stern et al., 2001; Abrao et al., 2006; Podgaec et al., 2007; Pupo-Nogueira et al., 2007; Machado et al., 2008; Olovsson, 2011; Podgaec et al., 2012; Bellelis et al., 2013; Chaudhury et al., 2013; Salmeri et al., 2015; Sofo et al., 2015). O tratamento cirúrgico e o bloqueio hormonal ainda são os mais utilizados, mas suas complicações a curto e longo prazo muitas vezes limitam a utilização, além dos resultados em termos de controle de sintomas e tamanho das lesões, poderem ser limitados (Konickx et al., 1991; Chapron et al., 2003; Bassi et al., 2011; De Cicco et al., 2010; Kondo et al., 2011; Mabrouk et al., 2011; Nezhat et al., 2011; Simoens et al., 2012; Ribeiro et al., 2014; Abrao et al., 2015; Magrina et al., 2015; Rausei et al., 2015; Lagana et al., 2016; Selvi Dogan et al., 2016; Giussey et al., 2017).

Assim, novas modalidades terapêuticas têm sido desenvolvidas, levando-se em conta as características metabólicas da endometriose, os efeitos colaterais e as complicações dos tratamentos atualmente disponíveis. Um exemplo das opções de tratamento clínico da endometriose é o dispositivo intrauterino liberador de levonorgestrel, que induz atrofia endometrial sem, no entanto suprimir a ovulação, concorrendo para diminuição da dismenorréia e controle eventual das dimensões dos nódulos da doença. Entretanto, os resultados do tratamento hormonal exclusivo não são resolutivos para todas as pacientes (Elnashar, 2015).

Outra opção para tratamento da endometriose é o uso dos inibidores da aromatase P450, responsável pela biossíntese local de estrogênio pelos focos endometrióticos. As drogas mais utilizadas deste grupo são o anastrozol e o letrozol, ambos com bons resultados no controle de sintomas e do tamanho dos nódulos

endometrióticos, devido ao hipoestrogenismo causado. Entretanto, este estado hipoestrogênico pode levar a efeitos colaterais sistêmicos, aumentando riscos a longo prazo, como a ocorrência de osteoporose. Também parece haver recorrência dos sintomas álgicos e das lesões em caso de interrupção do tratamento, mesmo que este seja de pelo menos seis meses (Elnashar, 2015).

Os moduladores seletivos de receptores estrogênicos (raloxifeno) e progestagênicos (mifepristona e onapristona), também vêm sendo estudados em animais, para controle da endometriose. Assim como os bloqueadores hormonais sistêmicos (agonistas GnRH, anticoncepcionais hormonais, progestagênios), têm efeito positivo sobre a endometriose, porém os resultados são limitados em caso de acometimento profundo ou extenso, além de não poderem ser mantidos a longo prazo (Elnashar, 2015; Vanhie et al, 2016; Wu et al, 2017).

Em animais, também foram testados inibidores da angiogênese (TNP470, endostatina, anginex, capamicina) para tratamento da endometriose, uma vez que há estudos que mostram aumento do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e das enzimas Matriz Metaloproteinases nas lesões. Associados ao tratamento cirúrgico, preveniram neovascularização dos sítios de endometriose e parecem ter bons resultados na endometriose inicial. Entretanto, na endometriose com maior percentual de fibrose e envolvimento profundo, os resultados são limitados (Elnashar, 2015).

Alguns destes estudos experimentais foram feitos utilizando-se nanopartículas acopladas à droga ativa. O objetivo dos mesmos era diminuir o estresse oxidativo e a angiogênese através da eliminação dos radicais livres. Em 2013, Chaudhury et al. avaliaram nanopartículas de óxido de cério em ratos, com bons resultados, seguidos por Singh et al (2015), cuja avaliação em ratos também demonstrou bons resultados, ao acoplar doxíciclina e galato de epigallocatequina, à nanopartícula de ácido poli-lático-co-glicólico. Em 2016, o estudo de De Almeida Borges et al demonstrou diminuição da proliferação das células de endometriose em cultura in vitro, utilizando silicatos lamelares contendo resina de óleo de copaíba.

Também foi revisado o uso de estatinas para o tratamento da endometriose (Gibran et al, 2014). Nesta revisão, foram levantados treze estudos, com resultados positivos, uma vez que as estatinas atuam em quatro níveis relacionados à patogênese da endometriose: inibição das enzimas Matrizes Metaloproteinases (envolvidas na implantação tissular), atividade antiangiogênica, inibição da proliferação endometrial,

além de sua atividade antiinflamatória e controladora do estresse oxidativo. Entretanto, todos os estudos foram realizados em animais ou *in vitro*, e as estatinas têm riscos potenciais de efeitos colaterais, como rabdomiólise, desconforto gastrointestinal e diabetes em altas doses (Gibran et al, 2014).

Outros tratamentos, como imunomoduladores e metformina, também foram testados, porém com resultados inferiores e necessariamente associados à cirurgia (Gibran et al., 2014; Nothnick et al, 2016).

Desta forma, a observação de que os novos tratamentos têm resultados limitados ou não foram testados sem a associação com a cirurgia permite concluir que o tratamento clínico hormonal atual ainda tem papel importante no controle da sintomatologia álgica. Por outro lado, não promove diminuição dos nódulos endometrióticos profundos (Roman et al., 2011). Além disso, por ser doença crônica e requerer tratamento de longa duração, a terapêutica clínica ainda enfrenta limitações pelos potenciais efeitos colaterais e por não beneficiar pacientes com queixa de infertilidade (Elnashar, 2015; Vanhie, 2016).

Portanto, o tratamento cirúrgico da endometriose permanece como opção terapêutica, em diversas situações, mas muitas vezes há dificuldades técnicas e as complicações podem ser graves. As taxas de complicações variam entre os estudos, mas as principais são recorrência das lesões (5,8 a 20%), fístulas (1,8 a 2,6%), hemorragias (2,0 a 2,5%), infecção (0,5 a 1,0%), suboclusão intestinal (0,2 a 2,7%), disfunção vesical e/ou intestinal (3,6 a 9,8%), entre outras (De Cicco et al., 2010; Kondo et al., 2011; Mabrouk et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Magrina et al., 2015; Rausei et al., 2015; Lagana et al., 2016). Além disso, há a necessidade de equipes especializadas para a realização dos casos de maior complexidade, demonstrando a necessidade de outras alternativas para controle dos nódulos endometrióticos profundos, bem como da sintomatologia clínica.

Uma das linhas de desenvolvimento deste tratamento apóia-se na nanotecnologia, onde drogas são acopladas a partículas que tenham afinidade com o tecido afetado, de forma a serem entregues diretamente às células doentes, sem efeitos sistêmicos significativos e com uma eficácia superior no controle das lesões. Em diversos tipos de câncer (linfoma Hodgkin, melanoma, carcinoma de mama e de ovário), em doenças reumatológicas (artrite reumatoide), na aterosclerose, no mieloma múltiplo e na cardiomiopatia diabética, onde há proliferação celular intensa e/ou

atividade inflamatória aumentada, a necessidade significativamente maior de LDL permitiu bons resultados utilizando-se a LDE (nanoemulsão artificial semelhante à LDL e que se liga ao mesmo receptor desta) acoplada a um quimioterápico, para entrega direcionada deste, apenas às células comprometidas (Dorlhiac-Llacer, 2001; Rodrigues et al., 2002; Maranhao et al., 2002; Azevedo et al., 2005; Pinheiro et al., 2006; Maranhao et al., 2008; Pires et al., 2009; Graziani et al., 2017; Lima et al., 2017; Maranhao et al., 2017).

Neste sentido, para haver lógica em estudar esse modelo em pacientes com endometriose, o estudo preliminar (Gibran et al, 2017) avaliou a presença de receptores de LDL nos focos de endometriose de 20 pacientes (o grupo controle, sem endometriose, tinha 19 pacientes). Neste estudo, foi avaliada a expressão gênica dos receptores de LDL na superfície das células de endometriose e do endométrio típico. Também foi avaliado o perfil lipídico de ambos os grupos. Em relação a este último, o grupo com endometriose apresentou níveis de LDL sérica mais baixos que o grupo controle, apesar de não ter sido estatisticamente significante. Foi ainda observado que os receptores de LDL estão superexpressos na membrana das células de endometriose profunda, mais que no endométrio típico das mesmas pacientes e dos controles (Gibran et al, 2017).

A avaliação seguinte do modelo trata-se do presente estudo, um projeto-piloto, cujo objetivo foi verificar se estes receptores de LDL, superexpressos nos focos de endometriose, captavam a LDE marcada.

Na comparação entre os grupos (com endometriose intestinal e não intestinal, grupo controle – tabela 1), não houve diferença significativa nos parâmetros clínicos ($p>0,01$), como idade, índice de massa corpórea e fase do ciclo menstrual, sendo, desta forma, grupos clinicamente semelhantes para comparação. Apesar disto, o grupo com endometriose intestinal tendeu a apresentar um IMC mais baixo que os demais, compatível com a metanálise de Zhu et al (2016), onde apesar da heterogeneidade dos grupos analisados, a presença e gravidade da endometriose foi inversamente proporcional ao IMC.

Esta diferença, apesar de não estatisticamente significante por ser um estudo-piloto com amostra pequena, também pôde ser observada em relação à sintomatologia (tabela 2): as mulheres do grupo controle não apresentavam sintomas da endometriose, e as do grupo endometriose intestinal eram mais sintomáticas do ponto de vista algico

que aquelas com endometriose não-intestinal. Respectivamente, 87,5 e 62,5% apresentavam dismenorréia, 66,7 e 62,5%, tinham dor pélvica crônica, além de 66,7 e 25,0% queixarem-se de alteração intestinal cíclica. Em contrapartida, as mulheres com endometriose não intestinal tinham mais sintomas de dispareunia de profundidade (100,0 versus 87,5% daquelas com endometriose intestinal), e alteração urinária cíclica 50,0 versus 16,7%). Tais achados corroboram os dados da literatura, onde observou-se que a endometriose profunda, com acometimento extenso, corresponde aos casos de maior sintomatologia (Cornillie et al., 1990; Konickx et al., 1991; Radhika et al, 2016; Soliman et al, 2017).

Em relação ao nível de colesterol, que indiretamente pode demonstrar o estado de alto metabolismo devido à inflamação e à alta divisão celular, o grupo com endometriose intestinal tendeu a apresentar níveis mais altos de LDL, em relação aos demais grupos: 121 mg/dL (controle: 112 mg/dL e endometriose não-intestinal, 87 mg/dL, $p > 0,01$ – tabela 3). Estes resultados confirmam estudos anteriores, que sugerem uma tendência a hipercolesterolemia nas mulheres com endometriose (Melo et al, 2010; Mu et al, 2017) e que também recomendam grupos maiores para esta avaliação no futuro.

Na Tabela 4, foi feita a comparação da captação da nanopartícula nos diferentes tecidos entre os grupos (controle, endometriose intestinal e endometriose não-intestinal). O peritônio tendeu a captar mais LDE nas mulheres com endometriose não intestinal (média de 712,3U), seguido pelos grupos controle e endometriose intestinal ($p > 0,1$). Nas lesões de endometriose intestinal, a captação média foi maior que na endometriose não-intestinal ($p > 0,1$), mostrando uma interiorização da LDL maior, o que sugere menos tecidos fibroticos na endometriose intestinal. No endométrio tópico, a tendência foi a média de captação da emulsão de LDE ser maior no grupo endometriose intestinal (1340,4 cpm/g), seguido pelo grupo controle (1152,3 cpm/g) e por último, o de endometriose não-intestinal (709,9 cpm/g; $p > 0,1$). Apesar destas tendências, na análise estatística destes valores, não houve diferença significativa da quantidade de nanopartícula captada entre os diferentes tecidos ($p > 0,01$), uma vez que este estudo se tratou de um estudo piloto, com n pequeno. Da mesma forma, a comparação da captação da LDE por cada local de avaliação (peritônio sadio, lesão de endometriose e endométrio tópico) também não mostrou diferença estatística entre os grupos (tabela 5 e figura 1), apesar da observação de uma tendência a captação

descrescente entre endométrio tópico (1067,5 cpm/g), peritônio sadio (564,7 cpm/g) e lesão de endometriose (189,2 cpm/g). Não há dados na literatura a respeito da captação da nanopartícula na endometriose.

Entretanto, o resultado de que os focos de endometriose (intestinal ou não) captaram de maneira significativa a LDE permite a conclusão de que há consumo aumentado de LDL nas lesões de endometriose, assim como no câncer e nas doenças inflamatórias onde a LDE foi testada como carreador de droga (Dorlhiac-Llacer, 2001; Rodrigues et al., 2002; Maranhao et al., 2002; Azevedo et al., 2005; Pinheiro et al., 2006; Maranhao et al., 2008; Pires et al., 2009; Graziani et al., 2017; Lima et al., 2017; Maranhao et al., 2017). Destes estudos, os mais recentes demonstram ausência de efeitos tóxicos clínicos e laboratoriais, além de resultados promissores em relação ao resultado do tratamento. No câncer de ovário, Graziani et al (2017) observaram desaparecimento do tumor em 28,6% das pacientes tratadas com o quimioterápico paclitaxel acoplado à LDE. Em roedores, os estudos em aterosclerose e miocardiopatia diabética (pós-infarto agudo) também demonstraram ótimos resultados em relação ao grupo controle, utilizando respectivamente paclitaxel e metotrexate acoplados à LDE (Lima et al., 2017; Maranhao et al., 2017).

Os resultados deste estudo são preliminares, mas ainda indicaram uma alta absorção da LDE marcada também pelo endométrio tópico (tabelas 4 e 5). Uma possível interpretação deste resultado é que o endométrio tópico é um tecido em grande divisão celular, ao proliferar, espessar e descamar ciclicamente num curto intervalo de tempo. Tal renovação cíclica de todo o tecido endometrial também sugere que a eventual captação da droga pelo mesmo não comprometeria sua função, uma vez que a apoptose celular aconteceria independentemente do tratamento e novas células surgiriam logo após o mesmo. Ainda assim, novos estudos são necessários para esta avaliação e, para tal, devem ser selecionados casos de mulheres sem desejo reprodutivo. Também novos estudos devem ser realizados para avaliar outras possibilidades de efeitos colaterais do tratamento, como alteração da reserva ovariana pela droga de bloqueio acoplada à LDE. A sequência deste estudo, avaliará estes efeitos quando da utilização do quimioterápico metotrexate acoplado à LDE.

No presente estudo, também foi avaliada a possibilidade de a captação da nanopartícula marcada pelos tecidos testados ter influência dos níveis de colesterol plasmático (tabela 6), e não houve diferença estatística entre os diversos grupos/tecidos,

comprovando a entrega direta da nanoemulsão aos tecidos em alta divisão celular, independente das lipoproteínas séricas.

Estes resultados abrem caminho para novos estudos de avaliação da nanotecnologia como opção terapêutica às cirurgias radicais e suas complicações. Além disso, por haver pouco ou nenhum efeito colateral sistêmico, quando esta tecnologia é comparada com os bloqueios hormonais sistêmicos atualmente disponíveis como opção terapêutica, novos estudos são estimulados na tentativa de desenvolvimento de um tratamento mais eficaz e com menos complicações que os atualmente disponíveis. Desta forma, por haver uma captação significativa da LDE pelos tecidos endometrióticos, o seguimento do modelo racional já está em andamento. Na sequência deste estudo, o projeto, já em fase de coleta de dados, avaliará o resultado terapêutico da LDE acoplada ao metotrexate, nas lesões de endometriose intestinal e na dor pélvica refratária ao tratamento clínico hormonal.

Neste estudo, a observação de que as lesões de endometriose têm boa afinidade pela LDE e a mesma é captada pelo tecido doente permite a continuação da avaliação da nanotecnologia como opção de tratamento não-cirúrgico para as lesões de endometriose profunda. Apesar de novos estudos serem necessários, com amostras maiores, o tratamento da endometriose com a utilização da LDE acoplada a drogas capazes de inibir a proliferação celular dos focos de endometriose, parece ser uma opção viável e promissora, como forma de diminuir os efeitos colaterais e as complicações dos tratamentos atualmente disponíveis.

6. Conclusão

6. Conclusão

Houve captação da nanopartícula lipídica de LDL marcada com ^{14}C pelo tecido endometriótico de pacientes com endometriose ovariana e profunda, pelo peritônio sadio adjacente às lesões e pelo endométrio, sendo que nas lesões de endometriose intestinal a captação média foi maior que na endometriose não-intestinal.

7. Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas¹

Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **International Journal Gynaecology Obstetrics**, v 82 n. 1, p. 31-40, 2003.

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. **Fertility Sterility**, v. 86, n.3, p. 543-547, 2006.

Abrao MS, Petraglia F, Falcone T, Keckstein J, Osuga Y, Chapron C. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 3, p. 329-339, 2015.

Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 1, p. 84-87, 2001.

Armengol-Debeir L, Savoye G, Leroi AM, Gourcerol G, Savoye-Collet C, Tuech JJ, Vassilieff M, Roman H. Pathophysiological approach to bowel dysfunction after segmental colorectal resection for deep endometriosis infiltrating the rectum: a preliminary study. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2330-2335, 2011.

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. **Gynecologic Oncology**, v. 97, n. 1, p. 178-182, 2005.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Bassi MA, Podgaec S, Dias Jr JA, D'Amico Filho N, Petta CA, Abrao MS. Quality of life after segmental resection of the retosigmoid by laparoscopy in patients with deep infiltrating endometriosis with bowel involvement. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 18, n. 6, p. 730-733, 2011.

Bayford R, Rademacher T, Roitt I, Wang SX. Emerging applications of nanotechnology for diagnosis and therapy of disease: a review. **Physiological Measurement**, v. 38, p. 183-203, 2017.

Bellelis P, Barbeiro DF, Rizzo LV, Baracat EC, Abrão MS, Podgaec S. Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis. **Fertility Sterility**, v. 99, n. 7, p. 1987-1993, 2013.

Cao Q, Lu F, Feng WW, Ding JX, Hua KQ. Comparison of complete and incomplete excision of deep infiltrating endometriosis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 11, p. 21497-21506, 2015.

Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, Barakat H, Dousset B, Pansini V, Vacher-Lavenu MC, Dubuisson JB. Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. **Human Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 157-161, 2003.

Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Breart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. **Human Reproduction**, v. 18, p. 760–776, 2003.

Chaudhury K, Babu K N, Singh AK, Das S, Kumar A, Seal S. Mitigation of endometriosis using regenerative cerium oxide nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, p. 439-448, 2013.

CNEM - Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. In <http://appasp.cnen.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm301.pdf>, 2014.

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. **Fertility Sterility**, v. 53, p. 978–983, 1990.

Darwish B, Roman H. Surgical treatment of deep infiltrating rectal endometriosis: in favor of less aggressive surgery. **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. 215, n. 2, p. 195-200, 2016.

De Almeida Borges VR, da Silva JH, Barbosa SS, Nasciutti LE, Cabral LM, de Sousa VP. Development and pharmacological evaluation of in vitro nanocarriers composed of lamellar silicates containing copaiba oil-resin for treatment of endometriosis. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 64, p. 310-317, 2016.

De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx PR. Bowel resection for deep endometriosis: a systematic review. **BJOG**, 118: 285-91, 2011.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 10, p. 1257-1263, 2001.

Elnashar A. Emerging treatment of endometriosis. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 20, p. 61-69, 2015.

English J, Sajid MS, Lo J, Hudelist G, Baig MK, Miles WA. Limited segmental rectal resection in the treatment of deeply infiltrating rectal endometriosis: 10 years' experience from a tertiary referral unit. **Gastroenterology Report**, v. 2, p. 288–294, 2014.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, p. 497-509, 1957.

Gabitova L, Gorin A, Astsaturov I. Molecular Pathways: Sterols and receptor signaling in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 23, p. 6344–6350, 2013.

Gibran L, Maranhao RC, Abrao MS, Baracat EC. Could statins constitute a novel treatment for endometriosis? Systematic review of literature. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 179, p. 153-158, 2014.

Gibran L, Maranhao RC, Tavares ER, Carvalho PO, Abrao MS, Podgaec S. mRNA levels of low-density lipoprotein receptors are overexpressed in the foci of deep bowel endometriosis. Human Reproduction, v. 32, n. 2, p. 332-339, 2017.

Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 14, p. 8216-8227, 1982.

Giudice LC. Clinical Practice: Endometriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 25, p. 2389–2398, 2010.

Giusy B, Facchin F, Meschia M, Berlanda N, Frattaruolo MP, Vercellini P. When Love Hurts. A Systematic Review on the Effects of Endometriosis Surgical and Pharmacological Treatments on Female Sexual Functioning. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 72, n. 2, p. 87-88, 2017.

Graziani SR, Igreja FAF, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amancio RF, Pinotti JÁ, Maranhao RC. Uptake of a Cholesterol-Rich Emulsion by Breast Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 85, n. 3, p. 493-497, 2002.

Graziani SR, Vital CG, Morikawa AT, Eyll BMV, Fernandes-Junior HJF, Kalil-Filho R, Maranhao RC. Phase II study of paclitaxel associated with lipid core nanoparticles (LDE) as third-line treatment of patients with epithelial ovarian carcinoma. **Medical Oncology**, v. 34, p. 151, 2017.

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 GBM cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 5, p. 442–456, 2011.

Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. - Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 52, n. 6, p. 1099-1114, 1978.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. In **Blackwell Science: 2nd ed.**, p. 502, 2006.

Kitahara CM, Gonzalez AB, Freedman ND, Huxley R, Mok Y, Jee SH, Samet JM. Total Cholesterol and Cancer Risk in a Large Prospective Study in Korea. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 12, p. 1592-1598, 2011.

Kok DE, van Roermund JG, Aben KK, den Heijer M, Swinkels DW, Kampman E, Kiemeny LA. Blood lipid levels and prostate cancer risk: a cohort study. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 14, n. 4, p. 340-345, 2011.

Kondo W, Bourdel N, Tamburro S, Cavoli D, Jardon K, Rabischong B, Botchorishvili R, Pouly JL, Mage G, Canis M. Complications after surgery for deeply infiltrating pelvic endometriosis. **BJOG**, v. 118, p. 292-298, 2011.

Kondo W, Ribeiro R, Trippia C, Zomer MT. Deep infiltrating endometriosis: anatomical distribution and surgical treatment. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 6, p. 278-284, 2012.

Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. **Fertility Sterility**, v. 55, p. 759–65, 1991.

Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. **Fertility Sterility**, v. 98, n. 3, p. 564-71, 2012.

Laganà AS, Vitale SG, Trovato MA, Palmara VI, Rapisarda AM, Granese R, Sturlese E, De Dominicis R, Alecci S, Padula F, Chiofalo B, Grasso R, Cignini P, D'Amico P, Triolo O. Full-Thickness Excision versus Shaving by Laparoscopy for Intestinal Deep Infiltrating Endometriosis: Rationale and Potential Treatment Options. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 3617179, 2016.

Leppälä J, Kallio M, Nikula T, Nikkinen P, Liewendahl K, Jääskeläinen J, Savolainen S, Gylling H, Hiltunen J, Callaway J, et al. Accumulation of ^{99m}Tc-low-density lipoprotein in human malignant glioma. **British Journal of Cancer**, v. 71, n. 2, p. 383-387, 1995.

Lima AD, Hua N, Maranhao RC, Hamilton JA. Evaluation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed mice during treatment with paclitaxel in lipid nanoparticles: a magnetic resonance imaging study. **The Journal of Biomedical Research**, v. 31, n. 2, p. 116-121, 2017.

Liu J, Xu A, Lam KSL, Wong NS, Chen J, Shepherd PR, Wang Y. Cholesterol-induced mammary tumorigenesis is enhanced by adiponectin deficiency: role of LDL receptor upregulation. **Oncotarget**, v. 4, p. 1805-1818, 2013.

Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, Sotgia F, Lisanti MP, Frank FG. Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 178, p. 402–412, 2011.

Mabrouk M, Montanari G, Guerrini M, Villa G, Solfrini S, Vicenzi C, Mignemi G, Zannoni L, Frasca C, Di Donato N, Facchini C, Del Forno S, Geraci E, Ferrini G, Raimondo D, Alvisi S, Seracchioli R. Does laparoscopic management of deep infiltrating endometriosis improve quality of life? A prospective study. **Health Quality of Life Outcomes**, v. 9, p. 98, 2011.

Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertility Sterility**, v. 90, n. 1, p. 148-155, 2008.

Magrina JF, Espada M, Kho RM, Cetta R, Chang YH, Magtibay PM. Surgical Excision of Advanced Endometriosis: Perioperative Outcomes and Impacting Factors. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 22, n. 6, p. 944-950, 2015.

Maranhao RC e Quintao ECR. Long term steroid metabolismo balance studies in subjects on cholesterol-free and cholesterol-rich diets: comparison between normal and hypercholesterolemic individuals. **Journal of Lipid Reserach**, v. 24, p 167-173, 1983.

Maranhao 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 10, p. 1003-1007, 1992.

Maranhao RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 691-696, 1993.

Maranhao RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena S, 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 Research**, v. 54, p. 4660, 1994.

Maranhao RC, Feres MC, Martins, MT, Mesquita CH, Toffoletto O, Vinagre C, Gianinni SD, Pileggi F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 126, p. 15-25, 1996.

Maranhao 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 Chemotherapy and Pharmacology**, v. 49, n. 6, p. 487-498, 2002.

Maranhao RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. Atherosclerosis,, v. 197, n. 2, p. 959-966, 2008.

Maranhao RC, Marques AF, Guido MC, Tavares ER, Bispo DL, Melo MDT, Salemi VM. Effects of treatment with methotrexate associated to lipid nanoparticles on diabetic cardiomyopathy in rats. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 48, 2017.

McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. **Chapman and Hall 2nd ed.**, p. 502 -511, 1989.

United States Nuclear Regulatory Commission. Measuring Radiation. In: **<https://www.nrc.gov/about-nrc/radiation/health-effects/measuring-radiation.html>**, 2017.

Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 552-558, 2007.

Melo AS, Rosa-e-Silva JC, Rosa-e-Silva ACJS, M.D., Poli-Neto OB, Ferriani RA, Vieira CS. Unfavorable lipid profile in women with endometriosis. **Fertility Sterility**, v. 93, n. 7, p. 2433-2436, 2010.

Mu F, Rich-Edwards J, Rimm EB, Spiegelman D, Forman JP, Missmer SA. Association Between Endometriosis and Hypercholesterolemia or Hypertension, **Hypertension**, v. 70, p. 59-65, 2017.

Munoz J, Jimenez JS, Tejerizo A, Lopez G, Duarte J, Bustos FS. Retosigmoid deep infiltrating endometriosis and ureteral involvement with loss of renal function. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 162, n. 2, p. 121-124, 2012.

Nezhat C, Hajhosseini B, King LP. Laparoscopic Management of Bowel Endometriosis: Predictors of Severe Disease and Recurrence. **Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, v. 15, n. 4, p. 431–438, 2011.

Nothnick W, Alali Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. **F1000Research**, v. 5, n. F1000 Faculty Rev, p. 186, 2016.

Olovsson M. Immunological aspects of endometriosis: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, suppl 1, p. 101-104, 2011.

Paquet F, Bayley MR, Leggert RW, Lipsztein J, Smith T, Nosske D, Eckerman KF, Berkovski V, Ansoborlo E, Giussani A, Bolch WE, Harrison JD. ICRP Publication 134: Occupational Intakes of Radionuclides: Part 2. **Annals of the ICRP**, v. 45, n. 3/4, p. 1-352, 2016.

Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 624-630, 2006.

Pires LA, Hegg R, Valduga CJ, Graziani SR, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 281-287, 2009.

Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1373-1379, 2007.

Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LFC, Baracat EC, Abrao MS. CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ Cells Increased in the Peritoneal Fluid of Patients with Endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, p. 1-8, 2012.

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. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 99, n. 1, p. 33-37, 2007.

Radhika A, Chawla S, Nanda P, Yadav G, Radhakrishnan G. A Multivariate Analysis of Correlation between Severity and Duration of Symptoms, Patient Profile and Stage of Endometriosis. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 6, p. 615-622, 2016.

Rausei S, Sambucci D, Spampatti S, Cassinotti E, Dionigi G, David G, Ghezzi F, Uccella S, Boni L. Laparoscopic treatment of deep infiltrating endometriosis: results of the combined laparoscopic gynecologic and colorectal surgery. **Surgical Endoscopy**, v. 29, n. 10, p. 2904-2909, 2015.

Redwine DB. Laparoscopic en bloc resection for treatment of the obliterated cul-de-sac in endometriosis. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 37, p. 695–698, 1992.

Ribeiro PA, Sekula VG, Abdalla-Ribeiro HS, Rodrigues FC, Aoki T, Aldrighi JM. Impact of laparoscopic colorectal segment resection on quality of life in women with deep endometriosis: one year follow-up. **Quality of Life Research**, v. 23, n. 2, p. 639-643, 2014.

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. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 765-772, 2002.

Roman H, Vassilieff M, Gourcerol G, Savoye G, Leroi AM, Marpeau L, Michot F, Tuech JJ. Surgical management of deep infiltrating endometriosis of the rectum: pleading for a symptom-guided approach. **Human Reproduction**, v. 26, n. 2, p. 274-281, 2011.

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 Research**, v. 50, n. 3, p. 483-487, 1990.

Ruffo G, Rossini R. The outcomes of laparoscopic resection of bowel endometriosis. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 25, n. 4, p. 302-307, 2013.

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? **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 107-114, 2008.

Salmeri FM, Lagana AS, Sofo V, Triolo O, MD, Sturlese E, Retto G, Pizzo A, D'Ascola A, Campo S. Behavior of Tumor Necrosis Factor- α and Tumor Necrosis Factor Receptor 1/Tumor Necrosis Factor Receptor 2 System in Mononuclear Cells Recovered From Peritoneal Fluid of Women With Endometriosis at Different Stages. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 2, p. 165-172, 2015.

Samadi-Baboli M, Favre G, Canal P, Soula G. Low density lipoprotein for cytotoxic drug targeting: improved activity of elliptinium derivative against B16 melanoma in mice. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 2, p. 319-326, 1993.

Schenken RS, Guzick DS. Revised Endometriosis Classification: 1996. **Fertility Sterility**, v. 67, n. 5, p. 815-816, 1997.

Sciumè C, Geraci G, Pisello F, Li Volsi F, Facella T, Modica G. [Intestinal endometriosis: an obscure cause of cyclic rectal bleeding]. **Annali Italiani di Chirurgia**, v. 75, n. 3, p. 379-84, 2004.

Selvi Dogan FD, Cottenet J, Douvier S, Sagot P. [Quality of life after deep pelvic endometriosis surgery: Evaluation of a French version of the EHP-30]. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 45, n. 3, p. 249-256, 2016.

Seracchioli R, Mabrouk M, Frascà C, Manuzzi L, Savelli L, Venturoli S. Long-term oral contraceptive pills and postoperative pain management after laparoscopic excision of ovarian endometrioma: a randomized controlled trial. **Fertility Sterility**, v. 94, n. 2, p. 464-471, 2010.

Seracchioli R, Ferrini G, Montanari G, Raimondo D, Spagnolo E, Donato ND. Does laparoscopic shaving for deep infiltrating endometriosis alter intestinal function? A prospective study. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 55, n. 4, p. 357-362, 2015.

Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol and Cancer, in the Balance. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1445-1446, 2014.

Simko V, Ginter E. Understanding cholesterol: high is bad but too low may also be risky -- is low cholesterol associated with cancer? **Bratislava Medical Journal**, v. 115, n. 2, p. 59-65, 2014.

Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, Brodsky V, Canis M, Colombo GL, DeLeire T, Falcone T, Graham B, Halis G, Horne A, Kanj O, Kjer JJ, Kristensen J, Lebovic D, Mueller M, Vigano P, Wulschleger M, D'Hooghe T. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. **Human Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1292-1289, 2012.

Singh AK, Chakravarty B, Chaudhury K. Nanoparticle-Assisted Combinatorial Therapy for Effective Treatment of Endometriosis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 5, p. 789-804, 2015.

Smith EB. Molecular Interactions in Human Atherosclerotic Plaques. **The American Journal of Pathology**, v. 86, n. 3, p. 665-674, 1977.

Sofo V, Götte M, Laganà AS, Salmeri FM, Triolo O, Sturlese E, Retto G, Alfa M, Granese R, Abrão MS. Correlation between dioxin and endometriosis: an epigenetic route to unravel the pathogenesis of the disease. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 292, n. 5, p. 973-986, 2015.

Soliman AM, Coyne KS, Zaiser E, Castelli-Haley J, Fuldeore MJ. The burden of endometriosis symptoms on health-related quality of life in women in the United States: a cross-sectional study. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 21, p. 1-11, 2017.

Stern RC, Dash R, Bentley RC, Snyder MJ, Haney AF, Robboy SJ. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 20, n. 2, p. 133-9, 2001.

Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 6, p. 689-701, 2009.

Thomas EJ, Campbell IG. Molecular genetic defects in endometriosis. - **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 50, Suppl 1, p. 44-50, 2000.

Touvier M, Fassier P, His M, Norat T. Cholesterol and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 3, p. 347-357, 2015.

Triolo O, Laganà A S, Sturlese E. Chronic Pelvic Pain in Endometriosis: An Overview. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 5, n. 3, p. 153-163, 2013.

Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. 99mTc-low density lipoprotein: intracellularly trapped radiotracer for noninvasive imaging of low density lipoprotein metabolism in vivo. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 68-79, 1990.

Vanhie A, Tomassetti C, Peeraer K, Meuleman C, D'Hooghe T. Challenges in the development of novel therapeutic strategies for treatment of endometriosis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 5, p. 593-600, 2016.

Vercellini P, Trespidi L, Colombo A, et al. A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. **Fertility Sterility**, v. 60, p. 75-79, 1993.

Versluis AJ, van Geel PJ, Oppelaar H, van Berkel TJ, Bijsterbosch MK. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 4, p. 525-532, 1996.

Vitols S, Peterson C, Larsson O, Holm P, Aberg B. Elevated uptake of low density lipoproteins by human lung cancer tissue in vivo. **Cancer Research**, v. 52, n. 22, p. 6244-6247, 1992.

Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1817-1822, 1991.

Wu B, Yang Z, Tobe RG, Wang Y. Medical therapy for preventing recurrent endometriosis after conservative surgery: a cost-effectiveness analysis. **BJOG**, DOI 10.1111/1471-0528.14786, 2017.

Zhu Q, Chen Y, Chen Z. The association between BMI and risk of endometriosis-a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 588-595, 2016.

8. Anexos

8. Anexos

ANEXO 1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP

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

PROJETO DE PESQUISA

Título: CAPTAÇÃO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA MARCADA RADIOATIVAMENTE POR RECEPTORES DE LDL EM MEMBRANA CELULAR DE FOCOS DE ENDOMETRIOSE PERITONIAL, OVARIANA E PROFUNDA

Pesquisador Responsável: Sergio Podgaec

Versão: 3

Pesquisador Executante: Alessandra Silva Bedin Ciminelli
Rubino

CAAE: 14892513.9.0000.0068

Co-autores: Raul Maranhão, Edmund Chada Baracat

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Sergio Podgaec

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10561

Número do Parecer: 435.641

Data da Relatoria: 16/10/2013

Apresentação do Projeto: O estudo "Captação de Nanoemulsão Lipídica Marcada Radioativamente por receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose peritonal, ovariana e profunda" apresenta introdução e objetivos claros e casuística adequada.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a captação da nanoemulsão lipídica de LDL marcada com C14 pelo tecido endometriótico de pacientes com endometriose peritonal, ovariana e profunda, no peritônio sadio adjacente e no endométrio tópico e como objetivo secundário, relacionar a captação da emulsão lipídica radiomarcada pelo tecido endometriótico de pacientes com endometriose, no peritônio sadio adjacente e no endométrio tópico com: 1) fase do ciclo menstrual; 2) quadro clínico da endometriose; 3) estadiamento da endometriose; 4) locais de acometimento da endometriose; 5) Avaliar o perfil lipídico de pacientes com endometriose e do grupo controle sem endometriose através da dosagem de: colesterol total; LDL; HDL; VLDL; triglicérides; Apo A1; Apo B 100; 6) Avaliar a cinética da solução lipídica marcada radioativamente, através de dosagens plasmáticas seriadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os autores justificam que os riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico e justificam com dados de literatura, o baixo risco da injeção da nanopartícula radioativa, uma vez que a irradiação recebida é 5X inferior a de um Raio X. Como benefícios, justificam que ambos os grupos (estudo e controle) serão submetidas ao tratamento da patologia que apresentam (endometriose), ou então

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

serão submetidas à esterilização cirúrgica que solicitaram. O benefício seria avaliar a captação da emulsão radioativa pelos receptores na superfície do foco endometriótico para, posteriormente, testar a capacidade da LDL de interiorização celular e, no futuro, poder selecionar uma droga para acoplamento nesta emulsão lipídica que seja capaz de destruir o foco endometriótico sem causar danos ao tecido sadio adjacente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisadores anexaram carta de anuência do Serviço de Patologia. Como não anexaram carta de anuência do laboratório clínico, supõe-se que os exames serão realizados no laboratório de lípidos do Incor.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: No parecer do relator, as pendências estão sanadas.

Recomendações: O projeto apresenta condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências ou inadequações.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 25 de Outubro de 2013

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

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes com Endometriose

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP¹

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: FEMININO
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:**
Captação de Nanoemulsão Lipídica Marcada Radioativamente por receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose peritoneal, ovariana e profunda.
2. **PESQUISADORA:** Dra Alessandra Bedin Ciminelli Rubino
CARGO/FUNÇÃO: Pós-Graduanda do Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 90.562
UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia – Setor de Endometriose

3. **AValiação DO RISCO DA PESQUISA:**
RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. **DURAÇÃO DA PESQUISA :** 2 anos

5. SOBRE A PESQUISA:

5.1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

A senhora está sendo convidada a participar do estudo que vai avaliar a quantidade de colesterol LDL (gordura do sangue) que a endometriose é capaz de guardar, para ser usada como fonte de energia.

Para isso, será feita uma pesquisa em laboratório para investigar, no material de biópsia removido durante a videolaparoscopia à qual a senhora será submetida, se os focos de endometriose recebem mais colesterol do que os tecidos sem a doença.

5.2 – PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E PROPÓSITOS:

Um dia antes da cirurgia, será feita uma injeção na veia, de um volume muito pequeno (0,1 mL) de uma substância parecida com a LDL, que é feita no nosso laboratório há mais de 20 anos. Essa injeção com radioatividade vai mostrar quanta LDL o peritônio, o endométrio e as células de endometriose são capazes de absorver.

Antes da injeção, será tirada uma amostra de sangue da veia para fazer outros exames relacionados com a gordura no sangue, e algumas amostras após a injeção, com o mesmo objetivo.

Na videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 ou 4 pequenos cortes na pele e o interior da barriga é observado em uma televisão, seu médico removerá o tecido doente e uma pequena amostra de tecido sadio chamado peritônio, que é um tecido de revestimento interno do abdome, próximo à região da doença, e também uma pequena amostra de endométrio normal, tecido de revestimento que se localiza dentro do útero. Estes tecidos serão enviados para a análise de um médico patologista. Após a confirmação do diagnóstico, uma amostra destes tecidos será encaminhada 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 do estudo são exatamente os mesmos da cirurgia, já que toda a análise é feita no laboratório, com os mesmos tecidos que seriam retirados durante a cirurgia normal.

A injeção da LDL marcada tem um risco baixíssimo, pois ela possui radioatividade em uma quantidade muito baixa, 5 vezes menos que um raio X. A quantidade de radioatividade que você vai absorver é muito pequena, 250 vezes menor que a dose permitida pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão que cuida da proteção de radiação no Brasil.

Para a realização dos exames e da cirurgia laparoscópica, é necessário estar 12 horas em jejum. Os riscos decorrentes dos exames são mínimos, relacionados à picada na veia que pode deixar uma mancha roxa no local. Os riscos da obtenção dos tecidos no intra-operatório da videolaparoscopia são mínimos e a remoção do foco endometriótico é exatamente a proposta de tratamento da doença.

5.4 – DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

A pesquisa não oferece risco ou desconforto, pois a remoção dos fragmentos de tecido comprometido pela doença representa o objetivo do tratamento, e os fragmentos de tecido sadio (peritônio e endométrio) serão representados por uma diminuta porção, as quais não oferecem qualquer dano à sua integridade.

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. Se a senhora não concordar em doar o fragmento da peça para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, 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 de sua parte, os pesquisadores se comprometem a descartar as amostras colhidas, imediatamente após sua notificação oficial ou de seus representantes legais.

A pesquisadora assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo.

A Dra. Alessandra Bedin Rubino 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.

A Dra. Alessandra Bedin C. Rubino estará à sua disposição, a qualquer momento, para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito da doença, deste estudo e de sua participação. O consultório da Dra Alessandra Bedin é R. Dr. Alceu de Campos Rodrigues, 229, cj 406, e o número do telefone é (11) 3845-5384, 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:

Dra Alessandra Bedin Ciminelli Rubino

R. Dr. Alceu de Campos Rodrigues, 229, cj 406, Bairro Itaim Bibi

Tel. (11) 3845-5384

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.

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(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 ____ / ____ / ____

ANEXO 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes sem Endometriose (Grupo Controle).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP¹

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: FEMININO
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:
Captação de Nanoemulsão Lipídica Marcada Radioativamente por receptores de LDL em membrana celular de focos de endometriose peritoneal, ovariana e profunda.

2. PESQUISADORA: Dra Alessandra Bedin Ciminelli Rubino
CARGO/FUNÇÃO: Pós-Graduanda do Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 90.562
UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia – Setor de Endometriose

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

5. SOBRE A PESQUISA:

5.1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

A senhora está sendo convidada a participar do estudo que vai avaliar a quantidade de colesterol LDL (gordura do sangue) que a endometriose é capaz de guardar, para ser usada como fonte de energia.

Para isso, será feita uma pesquisa em laboratório para investigar, no material de biópsia removido durante a videolaparoscopia à qual a senhora será submetida, se os tecidos sem a doença também recebem colesterol.

5.2 – PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E PROPÓSITOS:

Um dia antes da cirurgia, será feita uma injeção na veia, de um volume muito pequeno (0,1 mL) de uma substância parecida com a LDL, que é feita no nosso laboratório há mais de 20 anos. Essa injeção com radioatividade vai mostrar quanta LDL o peritônio e o endométrio normal são capazes de absorver.

Antes da injeção, será tirada uma amostra de sangue da veia para fazer outros exames relacionados com a gordura no sangue, e algumas amostras após a injeção, com o mesmo objetivo.

Na videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 ou 4 pequenos cortes na pele e o interior da barriga é observado em uma televisão, seu médico fará a laqueadura tubárea bilateral (ligadura das trompas) e uma pequena biópsia do peritônio, que é um tecido de revestimento interno do abdome, e também do 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 do estudo são exatamente os mesmos da cirurgia, já que toda a análise é feita no laboratório, com os mesmos tecidos que seriam retirados durante a cirurgia normal.

A injeção da LDL marcada tem um risco baixíssimo, pois ela possui radioatividade em uma quantidade muito baixa, 5 vezes menos que um raio X. A quantidade de radioatividade que você vai absorver é muito pequena, 250 vezes menor que a dose permitida pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão que cuida da proteção de radiação no Brasil.

Para a realização dos exames e da cirurgia laparoscópica, é necessário estar 12 horas em jejum. Os riscos decorrentes dos exames são mínimos, relacionados à picada na veia que pode deixar uma mancha roxa no local. Os riscos da obtenção dos tecidos no intra-operatório da videolaparoscopia são mínimos e a remoção do foco endometriótico é exatamente a proposta de tratamento da doença.

5.4 – DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

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

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. Se a senhora não concordar em doar o fragmento da peça para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, 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: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappel@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 de sua parte, os pesquisadores se comprometem a descartar as amostras colhidas, imediatamente após sua notificação oficial ou de seus representantes legais.

A pesquisadora assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo.

A Dra. Alessandra Bedin Rubino 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.

A Dra. Alessandra Bedin C. Rubino estará à sua disposição, a qualquer momento, para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito da doença, deste estudo e de sua participação. O consultório da Dra. Alessandra Bedin é R. Dr. Alceu de Campos Rodrigues, 229, cj 406, e o número do telefone é (11) 3845-5384, 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:

Dra Alessandra Bedin Ciminelli Rubino

R. Dr. Alceu de Campos Rodrigues, 229, cj 406, Bairro Itaim Bibi

Tel. (11) 3845-5384

8 - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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.

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

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

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

(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 ____ / ____ / ____

ANEXO 4. Tabela Completa de resultados, por paciente: idade, parâmetros clínicos e laboratoriais

Paciente	Idade	PESO	ALTURA	IMC	LOCAL	CT	HDL	LDL	TGL	Fase
										Ciclo
1	44	84,95	1,63	32	RC					17
2	38	69,9	1,58	28	IN+RC+OV					10
3	40	54	1,49	24,3	RC + OV	224	76	129	76	-
4	45	64	1,51	28,1	IN + OV	215	50	138	137	11
5	32	58,5	1,51	25,7	0	261	55	93	100	9
6	39	96,6	1,66	35,1	OV	129	37	68	120	4
7	47	65	1,55	27,1	RC + OV	151	46	86	97	10
8	27	103,8	1,68	36,8	0	191	35	130	129	7
9	32	68	1,62	25,9	RC + OV	103	33	49	106	13
10	30	72,1	1,62	27,5	IN	158	44	93	107	14
11	32	63	1,62	24	0					15
12	46		1,52		RC + OV	219	41	152	130	19
13	36	63,5	1,6	24,8	IN + OV					-
14	46	87	1,6	34	IN	221	46	131	221	21
15	32	85	1,73	28,4	BX + OV	89	35	45	46	18
16	37	68,2	1,53	29,1	BX + RC	164	53	77	171	4
17	21	50	1,53	21,4	IN + OV					5

RC=retrocervical / IN=intestinal / OV=ovariana / BX=bexiga

ANEXO 5. Tabela Completa de resultados, por paciente: peso do tecido coletado, captação da nanopartícula (LDE) bruta, e captação calculada (ajustada para 1g de tecido).

Paciente	LOCAL	PTP	PTE	PTEN	CP bruta	CE bruta	CEN bruta	CP*	CE*	CEN *
1	RC	1,24	1,91	0,26	728	75	143	523	0	242
2	IN + RC + OV	1,3	1,52	0,16	149	754	937	38	431	5238
								327	119	
3	RC + OV	0,22	0,33	0,25	820	492	988	7	1	3556
4	IN + OV	0,5	1,905	0,52	137	88	122	50	0	19
5	0	0,3		0,12	96		96	0		0
6	OV	0,26	0,22	0,05	119	132	111	54	123	120
		0,04								
7	RC + OV	8	0,59		126	153		333	73	
		0,02						146		
8	0	6		0,13	148		220	2		846
9	RC + OV	0,6	1,34	0,11	438	164	192	542	38	718
		0,05		0,037				134		
10	IN	13	0,27	6	81	73	53	5	226	1090
11	0	0,03		0,018	28		59	533		2611
		0,01								
12	RC + OV	8	0,77	0,25	26	76	65	778	83	212
		0,09	0,582	0,056						
13	IN + OV	58	9	9	26	46	17	146	58	88
14	IN	0,67	0,98		46	73		46	59	
15	BX + OV	0,85	1,07	0,78	19	22	31	5	7	21
16	BX + RC	0,07	0,17	0,05	26	24	18	186	65	100
17	IN + OV	0,04	0,09	0,03	24	41	21	275	311	267

RC=retrocervical / IN=intestinal / OV=ovariana / BX=bexiga /

PTP=peso tecido peritoneal / PTE=peso tecido endometriótico / PEN=peso tecido endometrial

CP=captção peritoneal / CE=captção endometriose / CPEN=captção endométrio