



**Avaliação da eficácia, segurança e tolerabilidade do Clotrimazol em modelo experimental de endometriose via regulação negativa a síntese do óxido nítrico induzível e biomarcadores de estresse oxidativo.**

**Mestranda:** Luciana de Campos Gomes Diniz

Duque de Caxias

2022

**Luciana de Campos Gomes Diniz**

**Avaliação da eficácia, segurança e tolerabilidade do Clotrimazol em modelo experimental de endometriose via regulação negativa a síntese do óxido nítrico induzível e biomarcadores de estresse oxidativo.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ como requisito básico para o título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientadores:**

Profº Dr. Daniel Escorsim Machado

Drº Leonardo da Cunha Boldrini Pereira

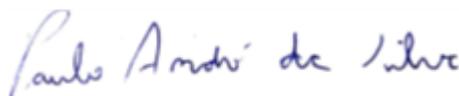
LUCIANA DE CAMPOS GOMES DINIZ

**Avaliação da eficácia, segurança e tolerabilidade do Clotrimazol em modelo experimental de endometriose via regulação negativa a síntese do óxido nítrico induzível e biomarcadores de estresse oxidativo.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (PPG-BIOTRANS), da Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

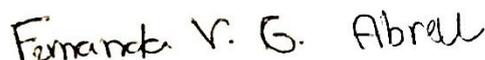
Aprovada em 16 de dezembro de 2022

### **BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Paulo André da Silva  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO  
Presidente da Banca



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Verdini Guimarães Abreu  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente



BRUNO LEMOS CONS  
Data: 17/01/2023 16:05:46-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

Prof. Dr. Bruno Lemos Cons  
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

**DUQUE DE CAXIAS  
2022**

Dedico esse trabalho a minha filha Maria Eduarda, que ainda não chegou a esse mundo, mas que desde a primeira batida do coração, me mostrou o significado do amor verdadeiro. E me motiva a não desistir dos meus sonhos.

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

D585a      Diniz, Luciana de Campos Gomes.  
Avaliação da eficácia, segurança e tolerabilidade do Clotrimazol em modelo experimental de endometriose via regulação negativa a síntese do óxido nítrico induzível e biomarcadores de estresse oxidativo / Luciana de Campos Gomes Diniz. – Duque de Caxias, 2022.  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado Programa de PósGraduação em Biomedicina Translacional) – UNIGRANRIO. Escola de Ciências da Saúde, 2022.

Orientadores: Daniel Escorsim Machado.  
Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.

1. Endometriose. 2. Clotrimazol. 3. Estresse oxidativo. I. Machado, Daniel Escorsim. II. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. III. Unigranrio. IV. Título.

CDD – 610

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo amor e carinho pelo qual tem cuidado de mim, dos meus familiares e amigos, por proporcionar momentos maravilhosos em minha vida, por guiar meus passos e colocar pessoas especiais no meu caminho.

Aos meus pais Adriana e Eduardo, pelo carinho, pelo apoio moral e incentivo. Ao meu irmão Dudu, que me proporciona boas gargalhadas e sempre muito carinhoso e cuidadoso comigo. Amo incondicionalmente!

Ao meu marido Matheus, que sempre busca o melhor para nós, sempre me incentivando a alcançar os meus sonhos e desejos. Te amo e me orgulho de você todos os dias.

A minha filha Maria Eduarda, que está ainda no meu ventre e colaborou para que hoje eu pudesse defender minha dissertação. Não vejo a hora de ter você em meus braços e viver cada momento juntas.

Ao meu avô José Gomes, que morro de saudades e ultimamente conversamos somente por chamada de vídeo. Mas que desde pequena me ensinou a jamais desistir, sempre se reinventar e não ter medo de trabalho. Sou grata por todos os momentos que vivemos juntos em 31 anos e espero reencontra-lo em breve.

Ao meu orientador Daniel, por ter aberto as portas do laboratório e me acolher como aluna, por toda paciência e dedicação. Por você tenho total admiração, desde a época da graduação.

Ao grupo do laboratório LAPESF e LAPAC, por toda ajuda ao longo do curso de mestrado e em especial o agradecimento a Dra. Jamila Perini e Dra. Jéssica Perini.

Ao Dr. Erico Saggioro e Msc. Sidney Sales Junior, pela colaboração a esse projeto.

Ao programa Biotrans, pela oportunidade em executar esse projeto, pela escolha do corpo docente que alavancou meu desenvolvimento profissional e pessoal.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

## Resumo

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pelo deslocamento do tecido endometrial para fora da cavidade uterina. Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da doença como a inflamação crônica, alterações hormonais e fatores genéticos. Durante a inflamação, são ativadas espécies reativas de oxigênio (ROS), produto da ativação de macrófagos na cavidade peritoneal, sendo fator fundamental na adesão do tecido endometrial, dano a nível celular, DNA e proteínas. O tratamento atual para endometriose é baseado na utilização de análogos combinados de andrógeno, progestágenos, antiprogestágeno e hormônio liberador de gonadotrofina ou cirúrgico (laparoscopia). A laparoscopia é um tratamento invasivo e apresenta recidiva da doença de 2 a 5 anos após. A terapia oral atua apenas no alívio dos sintomas e apresenta efeitos adversos. O clotrimazol (CTZ) é um antimicótico utilizado na medicina clínica para o tratamento de *Candida Albicans* e já demonstrou redução na produção de ROS, redução das lesões endometrióticas e desenvolvimento da doença. Esse projeto buscou verificar a segurança farmacológica e a tolerabilidade do tratamento com o clotrimazol em modelo experimental de endometriose.. Para o modelo experimental os animais foram tratados de acordo com protocolos aprovados pela CEUA da UEZO (009/2019). Dezoito ratas Wistar foram randomizadas em dois grupos após implantação endometrial autóloga e tratadas com CTZ (200 mg/kg) ou veículo via gavagem esofágica por 15 dias consecutivos. As análises macroscópicas, histológicas e imuno- histoquímicas da iNOS foram realizadas. Os níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S- transferase ( GST), glutathione (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PTC) foram medidos no cérebro e fígado. Ao final do tratamento ocorreu a diminuição do implante das lesões endometrióticas, a a iNOS foram significativamente menores em grupos CTZ em comparação ao controle. Os níveis hepáticos de LPO, PTC e SOD foram reduzidos e a atividade de GST aumentada. No entanto no cérebro não houve alteração nos níveis de SOD, GSH e GST. Os resultados sugerem que o CTZ interfere na produção de espécies reativas de nitrogênio ao diminuir a expressão de iNOS e assim potencializa o sistema antioxidante, promovendo a atrofia e regressão das lesões endometrióticas. Sem efeitos adversos do cérebro e / ou fígado. O CTZ é uma droga promissora para o tratamento da endometriose devido a sua eficácia e sem efeitos adversos.

Palavras-chave: Endometriose, Clotrimazol, estresse oxidativo

## Abstract

Endometriosis is a gynecological disease located by displacement of endometrial tissue outside the uterine cavity. Several factors originated for the development of the disease such as chronic inflammation, hormonal changes and genetic factors. During inflammation, reactive oxygen species (ROS) are activated, a product of the activation of macrophages in the peritoneal cavity, being a fundamental factor in the adhesion of endometrial tissue, damage at the cellular level, DNA and proteins. Current treatment for endometriosis is based on the use of combined androgen, progestogen, antiprogestogen and gonadotropin-releasing hormone or emergency analgesics (laparoscopy). Laparoscopy is an invasive treatment and presents recurrence of the disease 2 to 5 years later. Oral therapy acts only to relieve symptoms and has adverse effects. Clotrimazole (CTZ) is an antimycotic used in clinical medicine for the treatment of *Candida Albicans* and has already shown a reduction in ROS production, reduction of endometriotic lesions and disease development. This project sought to verify the pharmacological safety and tolerability of treatment with clotrimazole in an experimental model of endometriosis. For the experimental model, the animals were treated according to protocols approved by the CEUA of UEZO (009/2019). Eighteen Wistar rats were randomized into two groups after autologous endometrial implantation and treated with CTZ (200 mg/kg) or vehicle via esophageal gavage for 15 consecutive days. Macroscopic, histological and immunohistochemical analyzes of iNOS were performed. Levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO) and protein carbonylation (PTC) levels were measured in brain and liver. At the end of treatment there was a decrease in implantation of endometriotic lesions, and iNOS were significantly lower in CTZ groups compared to controls. Hepatic levels of LPO, PTC and SOD were reduced and GST activity increased. However, in the brain there was no change in the levels of SOD, GSH and GST. The results suggest that CTZ interferes with the production of reactive species in butterflies by decreasing iNOS expression and thus potentiates the antioxidant system, promoting atrophy and regression of endometriotic lesions. No adverse brain and/or liver effects. CTZ is a promising drug for the treatment of endometriosis due to its efficacy and no adverse effects.

Keywords: Endometriosis, Clotrimazole, Oxidative Stress

## Lista de figuras e tabelas

**Figura 1** Anatomia do Aparelho Reprodutor Feminino

**Figura 2:** Órgão genital feminino interno, retratando a anatomia do útero, vagina e tuba uterina.

**Figura 3:** Camada superficial do endométrio durante a fase proliferativa, mostrando o epitélio superficial e glândulas uterinas envolvidas pela lâmina própria composta por tecido conjuntivo frouxo.

**Figura 4:** Ciclo menstrual

**Figura 5 :** Equilíbrio redox entre moléculas pró- inflamatórios e moléculas antioxidantes.

**Figura 6:** Estrutura química do Clotrimazol.

**Figura 7:** Mecanismo de ação da classe Azóis, agindo diretamente no componente de membrana celular fúngica ergosterol e provocando a inibição de 14- lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase.

**Figura 8:** Protocolo experimental de estabelecimento da lesão e tratamento.

**Figura 9:** Efeito do tratamento do Clotrimazol em modelo experimental de endometriose, em relação a análise macroscópica e morfológica das lesões endometrióticas.

**Figura 10:** Efeito do tratamento com clotrimazol na quantificação de iNOS no tecido endometrial com a técnica de imuno-histoquímica

**Figura 11:** Efeitos do tratamento com antimicótico clotrimazol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

**Figura 12:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima catalase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

**Figura 13:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima glutathione S tranferase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose

**Figura 14:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima glutathiona no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

**Figura 15:** Efeitos do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose

**Figura 16:** Efeitos do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de proteínas carbonilada (PTC) no cérebro e fígado ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

**Figura 17.** Análise de componentes principais (PCA), parâmetros obtidos de peso, GSH,SOD,iNOS, MDA e PTC, utilizando apenas fígado.

## Lista de abreviaturas

CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTZ	Clotrimazol
CYP450	Citocromo p450
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GP <sub>x</sub>	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
HE	Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula-1
IL-1 $\beta$	Interleucina- 1 $\beta$
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KMO	Kaiser-Meyer- Olkin
MDA	Malondialdeído (MDA)
NOS	Óxido nítrico sintase
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
ON	Óxido nítrico
OH	Radical hidroxila
PBS	Solução tamponada com fosfato (PBS)
PCA	Análise dos componentes principais
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RCS	Espécies carboniladas reativas

SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobartitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
U	Unidade enzimática internacional
UPR	Proteína desdobradora
VEGF	Fator vascular de crescimento endotelial
VEFRG	Receptor de fator de crescimento endometrial vacular

## Sumário

1.0-Introdução .....	15
16.1..... Siste ma Reprodutor Feminino.....	15
16.2..... Endo mério .....	17
16.3..... Endo metriose .....	20
16.4..... Estre sse Oxidativo.....	22
16.5..... Estre sse Oxidativo x Endometriose .....	24
16.6..... Clotri mazol .....	27
2. JUSTIFICATIVA .....	31
3. OBJETIVOS .....	32
3.1. Objetivo geral .....	32
3.2. Objetivos específicos .....	32
4 - METODOLOGIA .....	33
4.1. Animais .....	33
4.2. Modelo experimental .....	33
4.3. Tratamento com Clotrimazol .....	34
4.4. Histologia, imunohistoquímica e análise morfométrica.....	35
4.5. Preparo do tecido para os ensaios de estresse oxidativo .....	35
4.6. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	36
4.7. Quantificação da atividade da enzima catalase .....	36
4.8. Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase.....	36
4.9. Quantificação da atividade da glutathione-S-Transferase (GST) .....	37
4.10. Quantificação da glutathione reduzida (GSH) .....	37
4.11. Quantificação de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico .....	37

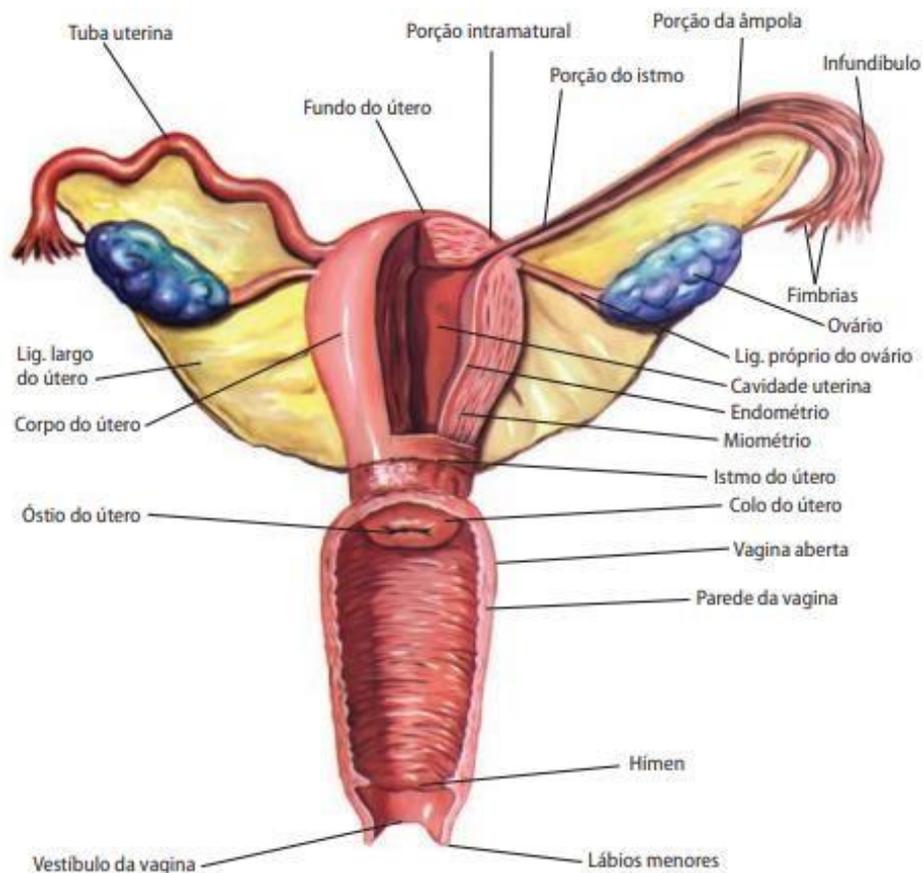
4.12. Quantificação da carbonilação de proteínas .....	38
4.13. Análise estatística .....	38
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre as lesões endometrióticas em ratas Wistar.....	39
5.2. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a quantificação de iNOS em tecido endometrial.....	41
5.3. Efeito do tratamento com Clotrimazol sobre a atividade da enzima Superóxido dismutase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose .....	43
5.4. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da enzima catalase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose .....	44
5.5. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da enzima glutathione S transferase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose .....	45
5.6. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da Glutathione redutase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose....	46
5.7. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de Malondialdeído no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.....	47
5.8. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de Proteína carbonilada no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose....	48
5.9. Análise de componentes principais (PCA) .....	49
<b>6. Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>55</b>
<b>8.Referência bibliográfica.....</b>	<b>56</b>

## 1.0- INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema Reprodutor Feminino

O sistema reprodutor feminino é formado por um conjunto de glândulas e estruturas funcionais capazes de produzir hormônios sexuais, tendo função de proteger e suprir as necessidades de uma evolução embrionária. Os órgãos que fazem parte desse sistema são o útero, os ovários, tubas uterinas, vagina e vulva (**Figura 1**) (MARTI *et.al.*2014)

**Figura 1:** Anatomia do Aparelho Reprodutor Feminino. Ilustração do aparelho reprodutor feminino interno.



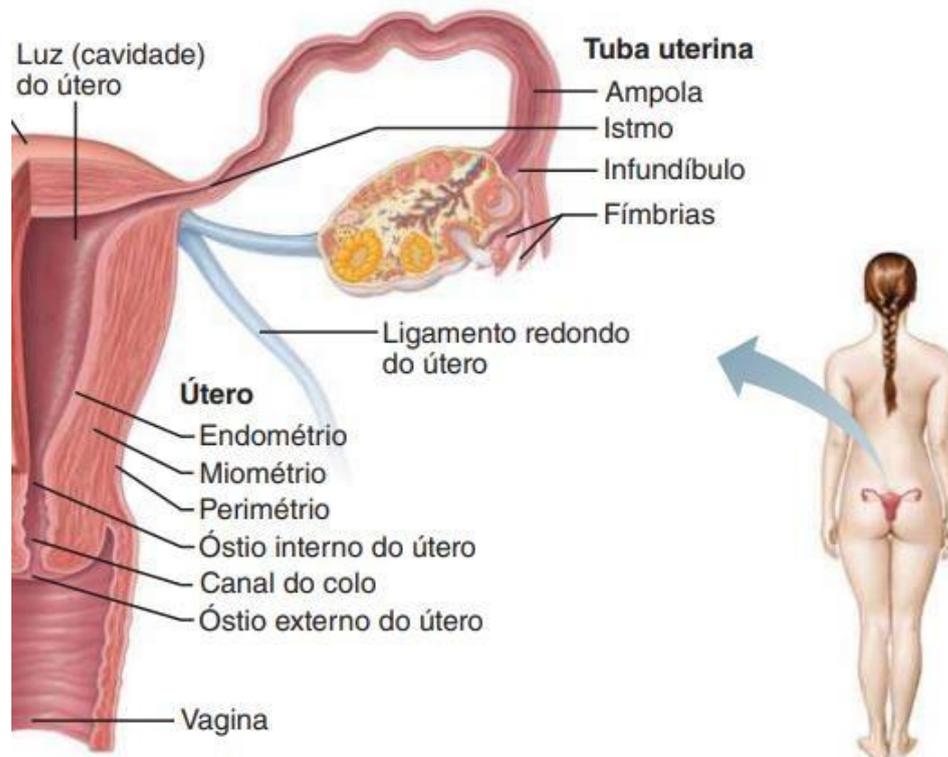
Fonte: DUARTE,2014

Os ovários são glândulas essenciais para regulação do ciclo menstrual e liberam hormônios sexuais (estrogênio e progesterona), que desempenham papel na regulação do ciclo menstrual, controlam o desenvolvimento de características sexuais e atuam sobre o útero na fixação do óvulo fecundado. Anatomicamente, os ovários têm formato amendoado, ficam suspensos entre a parede lateral pélvica e o útero, ligado pelo infundíbulo pélvico e ligamento útero-ovariano medialmente, tendo seu formato elipsoide e tem por característica a presença de folículos em idade reprodutiva (DUARTE,2014; ROACH & ANDREOTTI,2017).

A tuba uterina é um tubo de aproximadamente 8 cm de comprimento, e está localizada entre os ovários e o útero, sendo o local que ocorre a fecundação. A tuba uterina é composta por quatro partes: a uterina, parte localizada dentro da parede do útero; o istmo, região mais estreita da tuba uterina; a ampola, local onde ocorre a fecundação e é mais dilatada; e o infundíbulo, porção final onde se encontram as fímbrias, responsáveis pela captação do óvulo liberado pelo ovário para dentro da tuba uterina (DUARTE,2014)

O útero é uma estrutura muscular oca e seu formato se assemelha a uma pêra invertida, e está localizado na cavidade pélvica entre a bexiga urinária e o posteriormente ao reto. O útero, recebe o óvulo fecundado e é responsável pelo desenvolvimento gestacional até o dia do nascimento. O órgão é dividido em fundo do útero, sendo a região superior e acima da entrada das tubas uterinas, o corpo do útero, sendo a região mais distendida e onde ocorre a fixação do embrião, e colo ou cérvix do útero, no qual se alarga se ligando a vagina. A parede do útero é dividida em três partes: perimétrio, miométrio e endométrio, sendo o miométrio a camada média de tecido muscular liso, o perimétrio é a camada externa formada por peritônio que reveste o útero, e o endométrio a camada mais interna que reveste o útero e sofre ações hormonais durante o ciclo menstrual (**Figura 2**). (DUARTE,2014; RUIZ,2017).

**Figura 2:** Órgão genital feminino interno, retratando a anatomia do útero, vagina e tuba uterina.



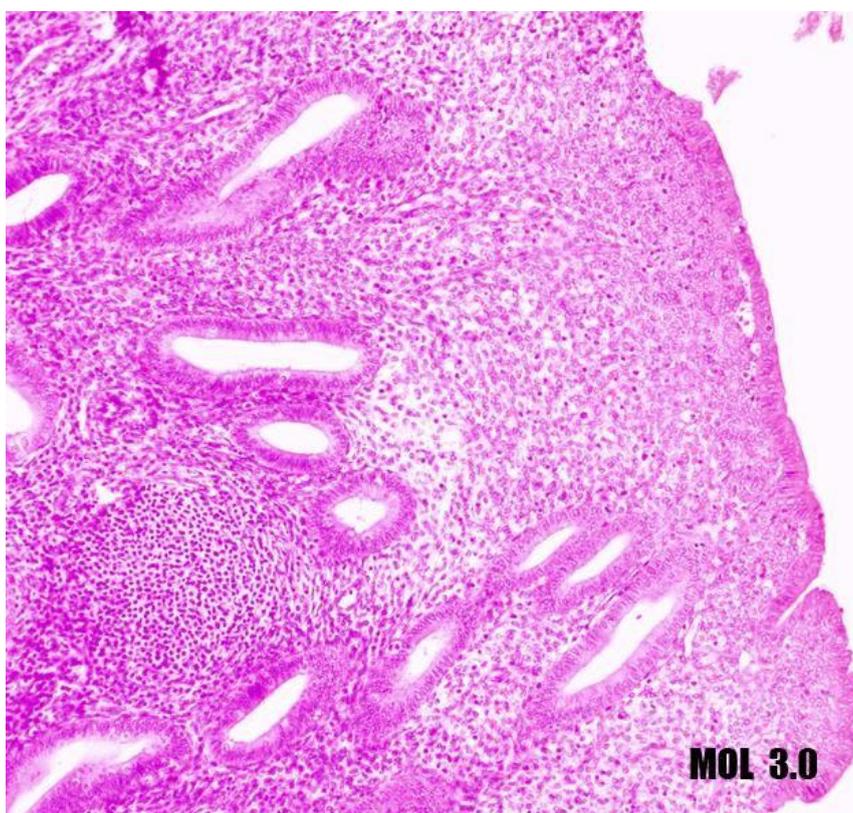
Fonte: Adaptado de Marieb *et.al.*,2014

## 1.2. Endométrio

O tecido endometrial reveste a camada interna do útero e influencia diretamente na manutenção da estrutura e nas funções de órgãos do sistema reprodutor feminino. Possui um epitélio e uma lâmina própria que se caracterizam por conter glândulas tubulares, que formam invaginações que darão origem a glândulas espiraladas e ramificadas, vindas do lúmen até a camada circular interna do miométrio (**Figura 3**). As células endometriais se organizam em um epitélio colunar simples formado por células cilíndricas e células secretoras. O tecido conjuntivo da lâmina própria é rico em fibroblastos e a fibra mais abundante é o colágeno do tipo III. O tecido é subdividido em duas camadas: camada basal, caracterizada por ser mais profunda, adjacente ao miométrio e formada por tecido conjuntivo e glândulas

uterinas. Já a camada funcional, é constituída pelo restante do tecido conjuntivo da lâmina própria, pela porção final e a porção onde desembocam as glândulas. Importante ressaltar que a camada funcional, sofre mudanças constantes durante o ciclo menstrual e a camada basal, permanece inalterada (ILESANMI.*et.al.* 1993, JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

**Figura 3:** Camada superficial do endométrio durante a fase proliferativa, mostrando o epitélio superficial e glândulas uterinas envolvidas pela lâmina própria composta por tecido conjuntivo frouxo.

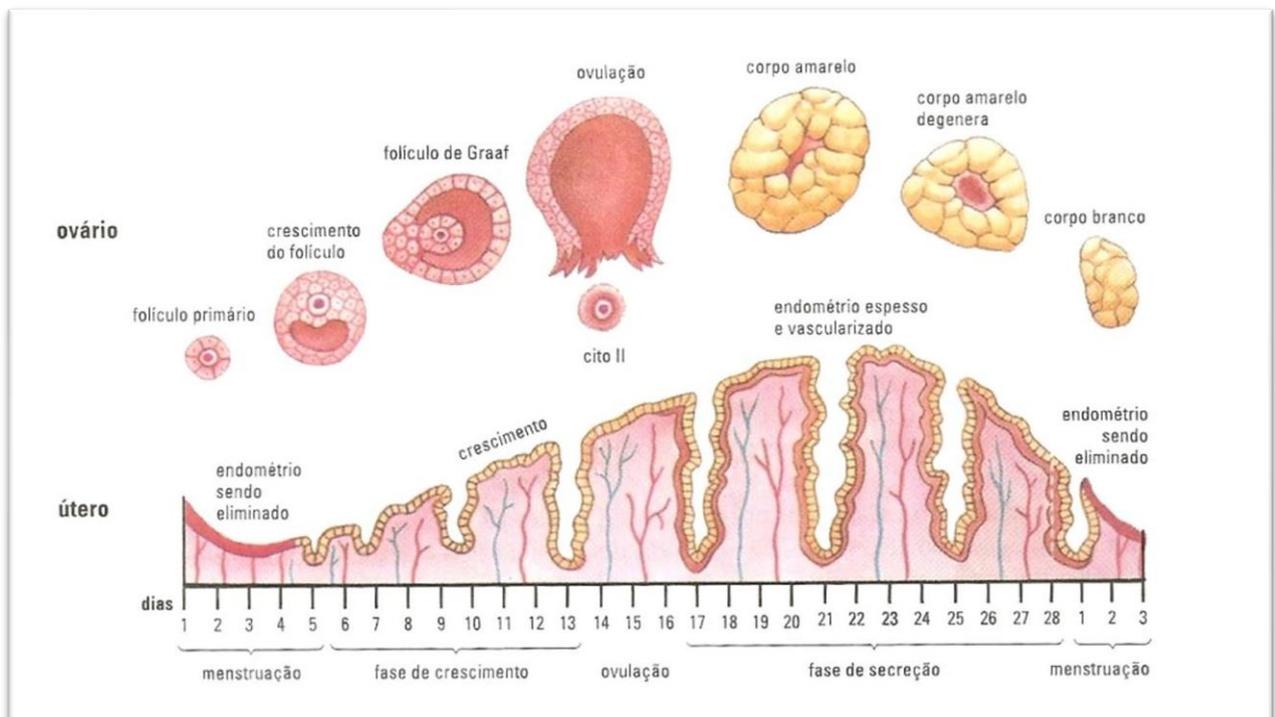


**Fonte:** Universidade de São Paulo. Disponível em : < <<https://mol.icb.usp.br/index.php/20-25-aparelho-reprodutor-feminino/>>

As células estromais e a matriz extracelular suportam o tecido glandular epitelial e o epitélio luminal, localizados na superfície. Além disso, o tecido endometrial é rico em vasos sanguíneos e células imunológicas (ILESANMI.*et.al.* 1993; FITZGERALD,*et.al.* 2021). A mulher sofre influências diretas de hormônios ovarianos, por estímulo da adeno-hipófise, fazendo com que o endométrio passe por mudanças estruturais cíclicas durante o ciclo menstrual, cujo qual tem duração de em média 28

dias. (JUNQUEIRA E CARNEIRO, DIAS *et.al.*,2005). De acordo com a **figura 4**, o ciclo inicia no primeiro dia de sangramento, que dura em média de 3 a 4 dias. Posteriormente, inicia-se a fase proliferativa, caracterizada pelo aumento na produção de estrogênio de forma crescente e assim estimulando o crescimento endometrial. Após a ovulação, o corpo lúteo é formado pelos resíduos do folículo rompido e este, secreta progesterona em altas concentrações com o objetivo de manter a gestação até a placenta se tornar funcional. No entanto, se não houver a fecundação e implantação do blastocisto no endométrio, os níveis de progesterona e estrogênio decaem provocando por consequência a descamação do endométrio e inicia um novo ciclo através da menstruação (UFRGS, TORTORA & DERRICKSON,2017).

**Figura 4:** Ciclo menstrual. A ilustração retrata o período menstrual, tendo um ciclo considerado normal de 28 dias, sendo iniciado, a partir da menstruação, onde ocorre a eliminação do endométrio. No 6º dia é retomado o crescimento do endométrio, este mediado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), ao mesmo tempo ocorre o crescimento do folículo e maturação do óvulo. No 14º dia ocorre um pico de hormônio Luteinizante (LH), liberando o óvulo e o endométrio é preparado para receber o óvulo fecundado através do aumento do hormônio progesterona. Caso não ocorra a implantação embrionário, ocorre a inibição dos hormônio LH,FSH, estrogênio e progesterona e novamente inicia-se um novo ciclo.



Fonte: Costa, 2014

Dessa forma, o endométrio é intimamente regulado por hormônios, sendo que um possível desequilíbrio pode ocasionar patologias, dentre elas a endometriose. A endometriose é uma patologia conhecida pelo crescimento ectópico do tecido endometrial em tecidos adjacentes ou localizado distantes do útero, como, por exemplo: intestino e bexiga (BULUN,*et.al.* 2019; KOBAYASHIA,*et.al.* 2021).

### **1.3. Endometriose**

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, caracterizada pela implantação do tecido endometrial em cavidade extrauterina, podendo comprometer a integridade de diversos órgãos adjacentes, tais como: os ovários, peritônio, ligamentos uterossacros, septo reto-vaginal, íleo terminal, bexiga, apêndice e ureteres. Sua etiologia ainda é desconhecida. Mas, a teoria da menstruação retrógrada proposta por Sampson em 1927 é a mais aceita, no qual propõe que o tecido endometrial retorna pelas tubas uterinas, se adere ao peritônio e cresce sob a influência de esteroides ovarianos (JOSHI *et al.*, 2017).

Os sintomas da doença estão associados à infertilidade, dor pélvica crônica, dor durante a menstruação (dismenorreia) e após a relação sexual (dispareunia). Porém, os sintomas não estão necessariamente relacionados com a severidade da doença, o que explica casos assintomáticos (PARASAR, 2017; SHIGESI *et al.*, 2019; ALOTAIBI *et al.*, 2019; RUSH *et al.*, 2019). Fourquet e colaboradores (2015) mostraram que há diferenças nas taxas de prevalência de certos sintomas e condições de comorbidade, embora os três sintomas cardinais da endometriose (dismenorréia, dispareunia e infertilidade) sejam universais e essas diferenças observadas podem ser explicadas por uma variedade de fatores, como, por exemplo o momento que a doença é diagnosticada.

O diagnóstico pode ser baseado em exames por imagem, como a ultrassonografia transvaginal, ressonância magnética e tomografia computadorizada (ANDRES, 2019). Entretanto, o diagnóstico definitivo é por laparoscopia seguido de biópsia, pois certifica a presença da doença e a sua extensão permitem a confirmação

histológica. Porém, a laparoscopia é um método invasivo, caro e não isento de riscos (ROLLA, 2019).

O tratamento da endometriose varia de acordo com os sintomas, a gravidade da doença e a necessidade de manter a fertilidade. Inclui a terapia medicamentosa, cirúrgica e a combinação de cirurgia e medicação. Os contraceptivos orais combinados incluem andrógenos, progestágenos, anti-progestágenos e análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH-a), esses fornecem alívio inicial da dor, mas a eficácia a longo prazo não apresenta evidências clínicas. Além disso, existem alguns dados que apoiam potenciais efeitos adversos na progressão da doença como dores de cabeça, edema, acne e irregularidades do ciclo, sangramento anormal, náuseas, ganho de peso e trombose, sangramento e ressecamento vaginal, hipossexualidade, osteoporose, sensibilidade mamária, insônia e depressão (DONG, 2019; ROLLA, 2019). Nesse contexto, a cirurgia torna-se relevante, mas existem taxas de recidiva da endometriose de 2 e 5 anos após a cirurgia e a taxa de recidiva após uma segunda cirurgia pode ser comparável a primeira cirurgia (HIDARI et al., 2019). Dessa forma, a busca por novos modelos de tratamento clínico para a endometriose é fundamental.

A endometriose é uma doença multifatorial e o estresse oxidativo tem sido proposto como um fator potencial envolvido na fisiopatologia da doença (VAN LANGENDONCKT, 2002). Desde a primeira descrição sobre a toxicidade do oxigênio feita por Joseph Priestley, o estresse oxidativo foi registrado como um fator-chave da endometriose, porque desempenha um papel importante na patogênese e na progressão da doença, visto que espécies reativas de oxigênio são liberadas após a estimulação crônica de macrófagos do líquido peritoneal (CARVALHO *et al.*, 2012; VAN LANGENDONCKT, 2002).

## 1.4. Estresse Oxidativo

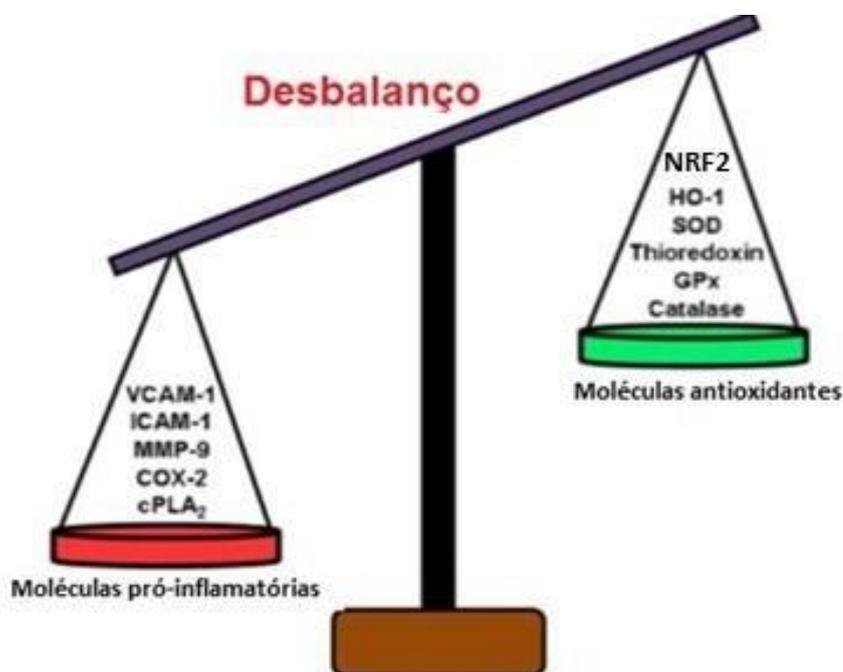
O estresse oxidativo caracteriza-se por um aumento desordenado de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição de enzimas antioxidantes. O dano oxidativo contribui para várias condições patológicas, incluindo desordens inflamatórias cardíacas, câncer, disfunções imunes, principalmente às doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) e a endometriose (BIRBEN *et al.*, 2012; SCUTIERO,2017).

A produção de ROS é parte importante em muitos processos fisiológicos, notadamente àqueles envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas (CHOO & MOON,2010;LEE & YANG,2012). No entanto, quando produzidos em concentrações elevadas por células inflamatórias ativadas (macrófagos, eosinófilos e neutrófilos) e células residentes (células musculares lisas e epiteliais), produzem modificações estruturais no DNA, desnaturação de moléculas e lesão tecidual (MACNEE, 2001; VAZIRI, 2008; SAHINER *et al.*, 2011). Dentre os produtos citotóxicos gerados destacam-se: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (ON) (KOURY & DONANGELO, 2003; DOZOR, 2010; PIRES *et.al.*, 2012).

O ON é sintetizado pela L-arginina, via ação de óxido nítrico sintase (NOS). Nas glândulas endometriais, é preeminente a isoforma NOS endotelial (eNOS) e esta desempenha um papel crítico na implantação do blastocisto. Com o maior número de macrófagos ativados na região peritoneal, ocorre o aumento de ON e óxido nítrico sintase indizível (iNOS) . As altas concentrações de ON podem provocar alterações nas reações pró-inflamatórias e no sistema imunológico peritoneal. Assim, estando relacionada a progressão da doença (KHORRAM & LESSEY,2002 ;YEO,2013)

Durante o processo inflamatório contínuo, há a superprodução de ROS e por reações metabólicas, esses radicais usam oxigênio para promover o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (**Figura 5**). Além disso, a ROS afeta a expressão de diversos fatores de transcrição, desequilíbrio redox e o remodelamento da cromatina, devido à alteração da desacetilação (LEE & YANG,2012 ; BIRDEN *et.al.*,2012) .

**Figura 5 :** Equilíbrio redox entre moléculas pró- inflamatórias e moléculas antioxidantes. Moléculas que participam do processo inflamatório e quando estão em desequilíbrio, provocam a intensificação da inflamação, lesões celulares e a progressão da doença.



**Fonte:** Adaptado, Lee & Yang,2012

De forma interessante, as ROS podem levar à peroxidação lipídica, resultando em disfunções estruturais e de permeabilidade das membranas. Esse evento leva à liberação do conteúdo das organelas e liberação de resíduos citotóxicos, como o malondialdeído, contribuindo assim para a apoptose (BOOTS *et.al.*,2003). Frente à resposta inflamatória contínua, o processo de peroxidação lipídica inicia-se quando um hidrogênio do ácido graxo polissaturado é sequestrado da membrana celular por um OH, havendo assim, formação de radical lipídico, que irá interagir rapidamente com o O<sub>2</sub>, resultando na formação de radical peroxila, que sequestra um novo hidrogênio de ácido graxo e inicia novamente essa cadeia. (FERREIRA & MATSUBARA,1997) Porém, a peroxidação lipídica pode acontecer quando há a interação de peróxidos lipídicos com oxidantes enzimáticos ou não enzimáticos que irão se ligar a íons de proteínas que contenham ferro, no que resultará em

hidrocarbonetos e aldeídos insaturados como subproduto (FERREIRA & MATSUBARA,1997; BOOTS *et.al.*,2003).

Para contrabalançar essa produção e seus potenciais efeitos deletérios, o organismo dispõe de um sistema antioxidante. Quando há a liberação das ROS, ocorre a ativação do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), fator de transcrição com importante papel na indução de enzimas antioxidantes, cuja finalidade é promover o equilíbrio redox no curso do estresse oxidativo nas células. Dentre os antioxidantes enzimáticos podemos destacar: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GP<sub>x</sub>). (CHO & MOON,2010; DOZOR,2010).

Essas espécies reativas de oxigênio podem aumentar o crescimento e as aderências de células endometriais na cavidade peritoneal, contribuindo no estabelecimento das lesões. Tal fato ocorre, devido aos macrófagos, eritrócitos e o tecido endometrial se transplantam para a cavidade peritoneal através da menstruação retrógrada e estes favorecem a indução do estresse oxidativo. Isso sugere que a produção exacerbada de ROS peritoneal pode estar ligada diretamente a endometriose (SCUTIERO,2017; AMREEN *et al.*, 2019).

## **1.5. Estresse Oxidativo x Endometriose**

Ota e colaboradores (2001) encontraram evidências de que a expressão da xantina oxidase, uma enzima que produz espécies reativas de oxigênio, no endométrio ectópico e eutópico, permaneceu alta durante todo o ciclo menstrual em mulheres com endometriose. A inflamação ocasionada pela endometriose, gera uma cascata que resulta na modulação de metaloproteinases, prostaglandinas, quimiocinas e citocinas. O aumento de fatores inflamatórios na cavidade peritoneal, resulta no aumento de Interleucina- 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que desempenha um papel fundamental na proliferação de células endometrióticas e esta estimula a produção de IL-6 e IL-8 em tecidos endometriais favorecendo a proliferação celular e a diminuição da apoptose. Além disso, a IL- 1 $\beta$  pode aumentar a expressão de molécula-1 (ICAM-1) nas células mesoteliais e assim sugerindo um forte papel na angiogênese. Além disso, o aumento de ciclooxigenase-2 (COX-2), Fator vascular de crescimento endotelial (VEGF), IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-10, estão

presentes no líquido peritoneal de mulheres com endometriose, sugerindo a pluripotência celular, produção de citocinas inflamatórias e aumento da adesão do estroma endometrial (SAMIMI et.al.2018).

Os eventos inflamatórios ocasionados durante a doença são regulados pelo NF- $\kappa$ B, importante indutor de proliferação celular, inflamação e inibidor da apoptose e este encontra-se em maior expressão no endométrio ectópico e eutópico. O NF- $\kappa$ B está ligado a uma família de proteínas p65 e são montados em dimmers no citoplasma. Quando inativo o NF- $\kappa$ B se liga ao inibidor I $\kappa$ B e quando ativado o NF- $\kappa$ B é translocado para o núcleo e o I $\kappa$ B fosforilado em resposta a diferentes estímulos e este se mostrou importante por aumentar os mediadores inflamatórios IL-6 e IL -8 na endometriose e assim favorecendo o desenvolvimento da doença. No entanto, em altas concentrações de ROS, comum na endometriose, ocorre o aumento da fragmentação do DNA, via estímulo de NF- $\kappa$ B aumentando a expressão de genes angiogênicos, fatores inflamatórios e adesão celular (GONZALEZ-RAMOS et al., 2010; KAPONIS, et al., 2012).

O aumento de ROS influencia no desequilíbrio redox no retículo endoplasmático (RE), que por sua vez influencia na proteína desdoadora (UPR), a ativar genes responsáveis pelo dobramento de proteínas e das enzimas antioxidantes a restaurar o RE. O acúmulo de proteínas mal dobradas e o estresse oxidativo na organela RE, desencadeia fatores celulares que irão determinar o caminho celular, podendo ser por autofagia, apoptose ou senescência (LIN et.al.,2020)

No entanto, as enzimas antioxidantes como CAT, GPX, SOD e Vitamina E, são enzimas fundamentais para acompanhar a progressão da doença, uma vez que durante o processo inflamatório intenso causado pela endometriose, favorece o desequilíbrio redox. A SOD catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Na literatura foi descrito que no plasma de mulheres com endometriose, esta enzima encontra-se em menor atividade, o que sugere a diminuição da capacidade antioxidante em mulheres com endometriose. Além disso, os níveis de malondialdeído (MDA) importante marcador de dano celular também encontra-se aumentado em mulheres com a patologia (SCUTIERO,2017, AMINI et.al.2021).

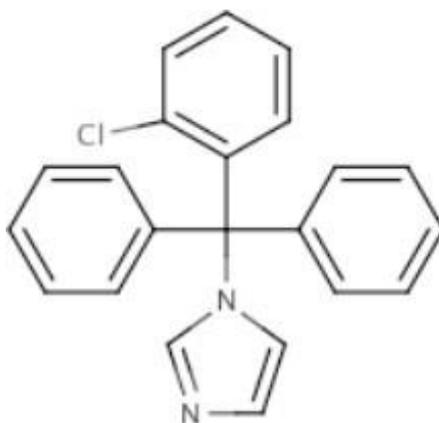
Sendo assim, desequilíbrio entre ROS e antioxidantes ocasionado pela inflamação crônica está associado aos sintomas comuns da doença, como a dismenorréia, dispareunia e a infertilidade. O aumento de ROS no microambiente folicular interfere negativamente na foliculogênese, maturação do oócito, ovulação e embriogênese (LIN *et.al.*,2020; AMINI,*et.al.*2021).

Conforme relatado anteriormente, o tratamento convencional da endometriose é baseado no uso de contraceptivos orais possuem diversos efeitos colaterais, tais como dores de cabeça, edema, acne, irregularidades no ciclo, sangramento anormal, náuseas, ganho de peso, trombose, sangramento, ressecamento vaginal, hipossexualidade, insônia, depressão e sensibilidade mamária. Nesse contexto, apesar de eficaz, a laparoscopia, padrão ouro do tratamento, submete ao paciente a cirurgia e tornando-se invasivo (DONG, 2019; ROLLA, 2019;KOBAYASHIA,*et.al.* 2021). Dessa forma, pesquisas com novos modelos de tratamento farmacológico para a endometriose são de extrema relevância.

## 1.6. Clotrimazol

O Clotrimazol é um derivado azólico pertencente a classe de imidazóis, criado em 1960, tendo atividade antimicótica de amplo espectro e sendo utilizado até os dias atuais para o tratamento de *Cândida Albicans* e outras infecções fúngicas e de tricomoníase resistente ao metronidazol e possui efeitos sob as bactérias Gram-positivas. A fórmula molecular desse medicamento é  $C_{22}H_{17}ClN_2$ , representado na **figura 6**. (CROWLEY & GALLAGHER, 2014).

**Figura 6:** Estrutura química do Clotrimazol. 1-[(2-chlorophenyl) (diphenyl)methyl] 1H-imidazole



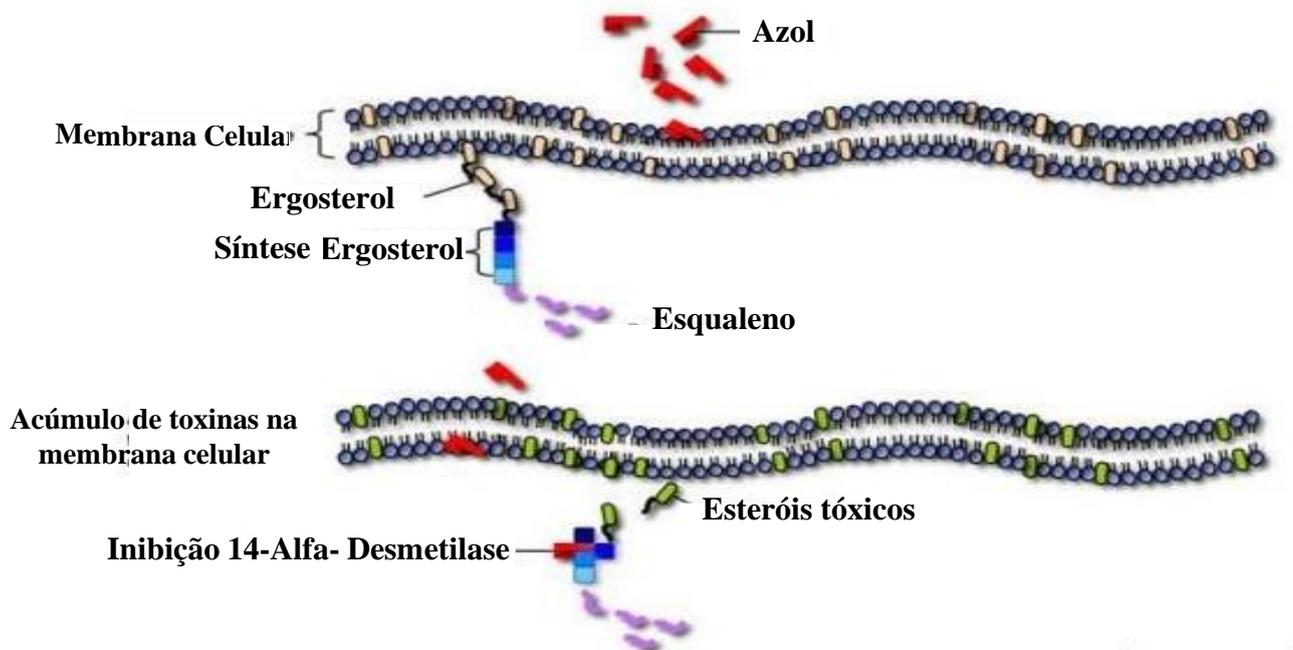
**Fonte:** CROWLEY & GALLAGHER, 2014

O clotrimazol é um medicamento de venda livre no Brasil e é comercializado como genéricos, similares e manipulados magistrais. O medicamento referência é o Canesten®, sua apresentação farmacêutica é em creme dermatológico e solução tópica, contendo 10 mg de clotrimazol. Popularmente é comercializado o Gino - Canesten®, comprimido vaginal com 500 mg de clotrimazol e o creme vaginal com as duas concentrações 50 e 100 mg (FERREIRA,2019).

O mecanismo de ação pelo qual o clotrimazol exerce como terapia antifúngica resulta na redução da síntese de ergosterol, sendo um importante componente da

membrana celular fúngica e fundamental para a biorregulação da fluidez, integridade da membrana celular e assimetria. Sendo assim, um potencial alvo da classe azóis. O medicamento age sob a inibição da desmetilação do 14- $\alpha$ -lanosterol dependente de citocromo p450 (CYP450) causa danos estruturais e funcionais da membrana citoplasmática fúngica (**Figura 7**) (EMS, MOREIRA,2010; KATZUNG,*et.al.* 2014).

**Figura 7:** Mecanismo de ação da classe Azóis, agindo diretamente no componente de membrana celular ergosterol e provocando a inibição de 14- lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase.



**Fonte:** Adaptado de Moreira,2010

Além do mecanismo de ação conhecido e bem descrito na literatura do clotrimazol, este medicamento se mostrou eficaz no tratamento da endometriose em modelo experimental. E esse mecanismo, foi descrito pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando que o clotrimazol está associado a regulação do estrogênio via regulação da aromatase. A enzima aromatase quando expressa favorece o aumento dos níveis de estrogênio em pacientes com endometriose, e o aumento está ligado diretamente a ação do CYP19A1 que é capaz de catalisar a conversão da testosterona e androstenediona em estradiol e estrona e assim aumentando a secreção de

estrogênio. No entanto, o clotrimazol foi capaz de regular negativamente o CYP19A1 e dessa forma diminuindo os níveis de estrogênio local e sistêmico e regressão das lesões endometrióticas (MACHADO, 2020).

Em outro artigo do nosso grupo, o clotrimazol foi capaz de diminuir os níveis de PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$ , secretado pelos macrófagos infiltrados, e diminuiu a expressão de VEGF e VEGFR-2 no tecido, sugerindo um efeito antiangiogênico nas lesões (Machado *et.al.*,2019). A angiogênese pode ser definida como o surgimento de novos vasos sanguíneos e este evento é mediado pelo VEGF e o receptor (VEFRG), o estímulo para indução da cascata angiogênica ocorre devido aos macrófagos peritoneais e das células endometriais em hipóxia, dessa forma as lesões tem por característica serem altamente vascularizadas (LIU *et.al.*,2016; ZANI,2017). A adesão do tecido em regiões extra uterinas e a presença de macrófagos na região peritoneal, são fatores que evidenciam a inflamação crônica e promovem o desequilíbrio redox (LI *et.al.*,2019).

O fígado é considerado o segundo maior órgão do corpo humano e encontra-se localizado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Esse órgão possui a veia porta, responsável pelo aporte sanguíneo do fígado, responsável por transportar sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes, vindo do intestino, pâncreas e baço. A artéria hepática, recebe o sangue rico em oxigênio vindo do tronco celíaco da aorta abdominal. A localização anatômica, bem como a circulação portal e sistêmica, possibilita que o fígado desempenhe as suas funções imunes e metabólicas (BICALHO,2019). O processo de biotransformação, que ocorre no fígado desempenha um papel fundamental onde compostos endógenos e exógenos são convertidos em metabólitos menos polares para facilitar a sua eliminação do corpo. Esse metabolismo pode ser dividido em três fases, sendo a fase I responsável pelas reações de funcionalização. A fase II, ocorre a reação de conjugação e a fase III é a eliminação do xenobiótico, esta mediada pelo sistema de transporte corporal, via fígado, rim e pulmão (ALMAZROO, *et.al.*,2017).

Conforme dados da literatura, o clotrimazol em modelo in vivo, foi capaz de induzir o aumento da expressão do gene CYP3A, apontando a transativação de Pregnane X (PXR), cujo qual é um receptor nuclear, capaz de induzir a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo e transporte de xenobióticos e

endobióticos. Bem como, as concentrações de enzimas hepáticas séricas aspartato aminotransferase e alamina aminotransferaminase foram diminuídas nos animais tratados com o CTZ. Indicando que o tratamento com o antimicótico CTZ reduz as lesões hepáticas (Sousa,*et al.*,2009).

Sendo assim, o tratamento com o clotrimazol se torna um potencial alvo terapêutico para pacientes com endometriose, uma vez que se mostra eficaz na regressão de lesões endometriais e dos parâmetros inflamatórios. Assim, o próximo passo é entender o mecanismo do clotrimazol no estresse oxidativo e observar se o uso desse medicamento pode acarretar possíveis efeitos adversos em modelo experimental da endometriose.

## 2. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença inflamatória ginecológica que acomete mulheres em idade reprodutiva em todo mundo, independente da raça ou classe social. Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), 180 milhões de mulheres tem endometriose e no Brasil, atinge cerca de 7 milhões de brasileiras em idade reprodutiva. A doença causa transtornos para a vida da mulher, como dores na região pélvica, dispareunia, desbalanço hormonal e infertilidade, refletindo em uma pior qualidade de vida para essas mulheres. Ainda nesse contexto, o tratamento para a endometriose é baseado de acordo com os sintomas e a gravidade da doença, utilizando contraceptivos orais combinados como andrógenos, progestágenos, anti-progestágenos e análogos do hormônio liberador de gonadotrofina. No entanto, esses medicamentos oferecem riscos ao paciente a longo prazo, devido aos efeitos adversos, como trombose, ganho de peso, sangramentos, insônia e depressão. Outra opção de tratamento é a laparoscopia, que envolve cirurgia, trazendo risco do procedimento para a paciente, e mesmo assim, existem taxas de recorrência da endometriose de 2 e 5 anos após a cirurgia.

Diante do exposto acima, torna-se relevante a busca de novos estudos para o tratamento farmacológico mais eficiente e com menos efeitos adversos para a endometriose. O antimicótico Clotimazol, se apresentou como um excelente tratamento em modelo experimental, aumentando a apoptose, diminuindo o VEGF e assim regredindo as lesões, diminuindo os marcadores inflamatórios e regulando os níveis de estrogênio. Sendo assim, o Clotrimazol, torna-se um potencial medicamento para o tratamento da endometriose, sendo eficaz e de baixo custo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar a segurança farmacológica e a tolerabilidade do tratamento com o clotrimazol em modelo experimental de endometriose.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Estabelecimento de modelo experimental de endometriose e análise macroscópica e histológica das lesões implantadas;
- Realizar tratamentos com clotrimazol nas lesões estabelecidas;
- Avaliação da distribuição de NO<sub>2</sub> no endométrio e nas lesões endometrióticas controle e tratadas;
- Análise de marcadores de estresse oxidativo catalase, superóxido dismutase, glutathione e glutathione S-transferase nas lesões, no fígado e no cérebro;
- Quantificação dos marcadores oxidativos malondialdeído e carbonilação de proteínas nas lesões, no fígado e no cérebro;

## **4 - METODOLOGIA**

### **4.1. Animais**

Foram utilizadas 20 Ratas Wistar com 8 semanas e pesando aproximadamente 200g, do gênero feminino, sendo tratadas de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (CEUA/UEZO (010.2015)).

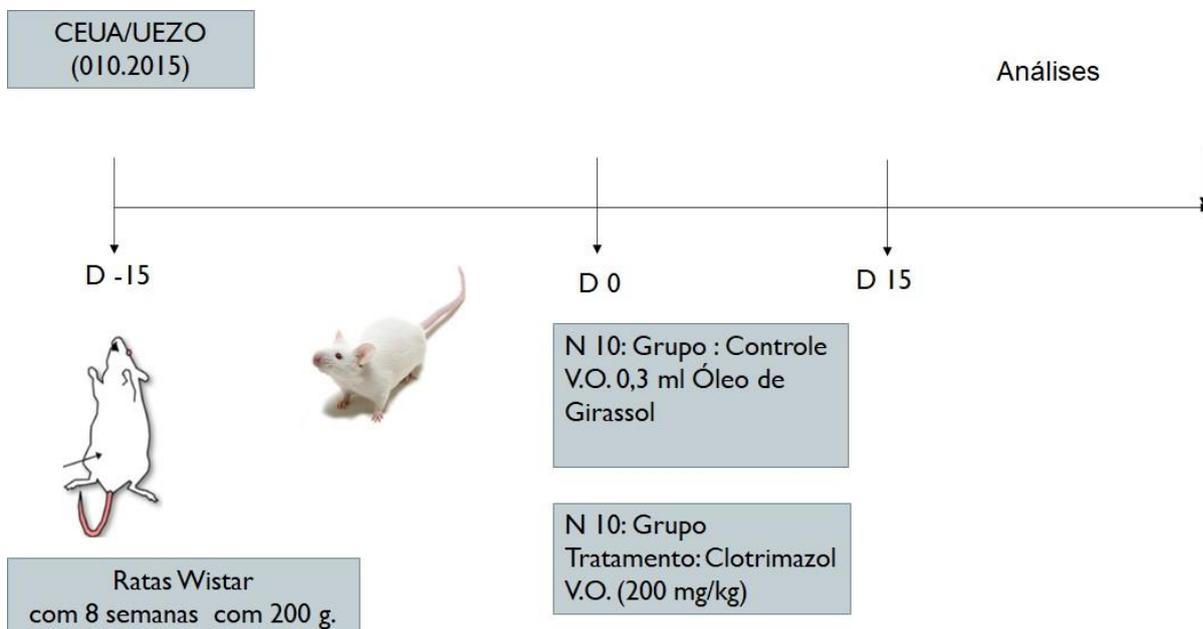
### **4.2. Modelo experimental**

As ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de ketamina e xilazina. Um corno uterino foi localizado e removido sendo colocado em solução salina, aberto longitudinalmente e seccionado para ser implantado na parede interna do peritônio por sutura de polipropileno (ProleneEthicon, Piscataway, NJ). O fechamento da parede abdominal foi feito com o mesmo fio de sutura usado para aderir à lesão a cavidade peritoneal. O tempo de estabelecimento foi de 15 dias. Após esse período, os animais foram submetidos novamente a anestesia, a cavidade peritoneal foi aberta e avaliado macroscopicamente a lesão e fotografada.

### 4.3. Tratamento com Clotrimazol

Após o estabelecimento das lesões de endometriose, os animais foram divididos em dois grupos, o primeiro grupo controle com 10 ratas receberam por via oral 0,3 ml de óleo de girassol, e o segundo grupo também com 10 ratas receberam por via oral 200 mg/kg de Clotrimazol (SIGMA ALDRICH) (**Figura 8**). O tratamento foi feito por 15 dias consecutivos, e após esse período foram feitas as análises utilizando o endométrio, as lesões endometrióticas, o cérebro e o fígado. Vale ressaltar, que em achados anteriores realizados pelo grupo o óleo de girassol não exerce efeito algum sobre as lesões endometrióticas, a dose de escolha não exerceu nenhum efeito adverso e não houve alterações em parâmetros hepáticos ou sanguíneos.

**Figura 8:** Protocolo experimental de estabelecimento da lesão e tratamento



#### **4.4. Histologia, imunohistoquímica e análise morfométrica**

As amostras contendo o endométrio e as lesões endometrióticas foram fixadas em formalina tamponada, após inseridas em parafina e cortados em secções com espessura de 4 µm. Uma parte dos cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscopia para avaliação histológica da endometriose. As outras secções foram colocadas em lâminas tratadas com silano e incubadas overnight com anticorpo policlonal contra iNOS (ab-3523, Abcam), em diluição 1:100 e reveladas utilizando LSAB2, Kit HRP, rato ( Dako-Cytomation, Carpinteria,CA,EUA) com diaminobenzidina (comprimidos de 3,3'-diaminobenzidina; Sigma, St. Louis, MO, EUA) como cromógeno e contracoloração com hematoxilina. A lâmina de controle negativo foi incubada com veículo de anticorpo. As lâminas foram analisadas através de um microscópio de luz (Nikon), conectado a uma câmera digital ( Coolpix 990; Nikon) com ampliação de 400x. Dez secções de campos imunocorados foram escolhidos de forma aleatória e capturadas imagens de alta qualidade (buffer de 2048 × 1536 pixels) e quantificadas as amostras no programa Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os scores histológicos foram avaliados e calculados com base na fórmula:  $H = \sum Pi$ , onde  $i$  é a intensidade que varia de 0 (células negativas) a 3 (células fortemente coradas) e  $P$  é a porcentagem de células coradas para cada dado  $i$ , com Valores de  $P$  de 1, 2, 3, 4 e 5 indicando 85% e 100% de células coradas positivamente. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (DP).

#### **4.5. Preparo do tecido para os ensaios de estresse oxidativo**

Foram utilizados os tecidos de cérebro e fígado, bem como as lesões endometrióticas para extração de biomarcadores enzimáticos (SOD, CAT, GST) e não enzimáticos (GSH). As amostras foram colocadas em solução tamponada com fosfato (PBS) na proporção de 1:100, e após a extração, os sobrenadantes foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores. Os biomarcadores enzimáticos foram expressos como unidade enzimática internacional (U) e o biomarcados não enzimático foi expresso na concentração molar.

#### **4.6. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford**

Para a dosagem de proteínas, foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). O reagente de Bradford (1mL) foi diluído em água destilada (4 mL), sob proteção da luz. Em seguida, foi feita a curva padrão em duplicata utilizando doses crescentes de albumina bovina e a solução de Bradford. Assim, estabeleceu-se o padrão de 1  $\mu$ L de amostra para 199  $\mu$ L de Bradford. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro INNO (LTEK Co. Moita, Portugal) à 592 nm. A partir dos resultados da leitura, foi feita a média das duplicatas das amostras e da curva, sendo os valores expressos em  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteína.

#### **4.7. Quantificação da atividade da enzima catalase**

A atividade da enzima catalase foi determinada pela velocidade de  $H_2O_2$  em altas concentrações, a partir do primeiro minuto de reação (1 minuto com  $\Delta t$  10 segundos). Para esse ensaio, foi preparado o "MIX", contendo 50 mL de água destilada e 80  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi adicionado 1  $\mu$ L de amostra para 199  $\mu$ L do MIX. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro INNO (LTEK Co. Moita, Portugal) em absorbância de 240 nm, utilizando-se placa UV. Os valores foram expressos por U/mg de proteína.

#### **4.8. Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pelo Kit fornecido pela Cayman Chemical Company ( Michigan,EUA). A curva com o padrão de SOD foi preparada anteriormente a determinação enzimática. Foi misturado as amostras o sal Tratazólico e Xantina oxidase em uma microplaca de 96 poços, após incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda_{max} = 450$  nm

#### **4.9. Quantificação da atividade da glutathione-S-Transferase (GST)**

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Habig, Pabst & Jakoby (1974). A GST presente na amostra catalisa a formação de tioésteres pela adição de GSH ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) . Em cubetas de quartzo são adicionados 100  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1M, 20  $\mu$ L de CDNB 0,1M, 20  $\mu$ L de GSH 0,1M e 20  $\mu$ L a amostra diluída 20x. Após um minuto de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro Bel uv-M51 (Bel, Monza, Itália)  $\lambda_{max}$  = 340 nm.

#### **4.10. Quantificação da glutathione reduzida (GSH)**

A quantificação da glutathione reduzida (GSH), foi realizada através de método colorimétrico. A curva de calibração utilizando padrão de GSH foi preparada e as amostras de cérebro e fígado foram diluídas cinco vezes. As amostras foram incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz na presença de ácido 2,2'-diitro-5,5'-ditiodibenzóico (DTNB; 0,25 mmol L<sup>-1</sup>) e a absorbância foi medida em  $\lambda_{max}$  = 412 nm, usando o leitor de microplacas INNO (LTEK Co. Moita, Portugal)

#### **4.11. Quantificação de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico**

Para a quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA), foi utilizado o método de TBARS descrito por Draper e colaboradores (1990), como parâmetro de peroxidação lipídica. As amostras de fígado e cérebro (100  $\mu$ L) foram misturadas em 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas por 15 minutos, a 3.600 RPM em temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e adicionado 150  $\mu$ L de ácido Tiobarbitúrico (TBA), as amostras foram aquecidas em banho-maria a seco a 95 °C, por 10 minutos. Níveis de MDA foram determinados por absorbância a 532 nm INNO (LTEK Co. Moita, Portugal) e expressas como nM/mg de proteína.

#### **4.12. Quantificação da carbonilação de proteínas**

Para determinação da quantificação de carbonilação de proteínas, foi utilizado o método colorimétrico adaptado de Mesquita et.al. 2014. As amostras foram diluídas 5 vezes, sendo 100 µL de amostra para 100 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As mostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e adicionado 50 µL de NaOH(6M) e incubada novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a leitura é realizada a 450 nm, na leitora de microplacas INNO (LTEK Co. Moita, Portugal)

#### **4.13. Análise estatística**

Os resultados foram expressos com média  $\pm$  DP e verificada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise de estatística foram realizadas com teste t Student e para análise morfométrica, os cálculos estatísticos foram realizados com o programa Stat-Xact5 (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de P foram  $\leq 0,05$ . A análise dos componentes principais (PCA), foi realizada com os resultados morfológicos (peso), imunológicos (iNOS) e bioquímicos, utilizando apenas o fígado. A adequação da PCA foi determinada pelo fator de adequação de Kaiser-Meyer- Olkin (KMO) e análise de correlação foi realizada com o Software R versão 3.5.2 e a plotagem gráfica foi realizada com o programa GraphPad Prism.

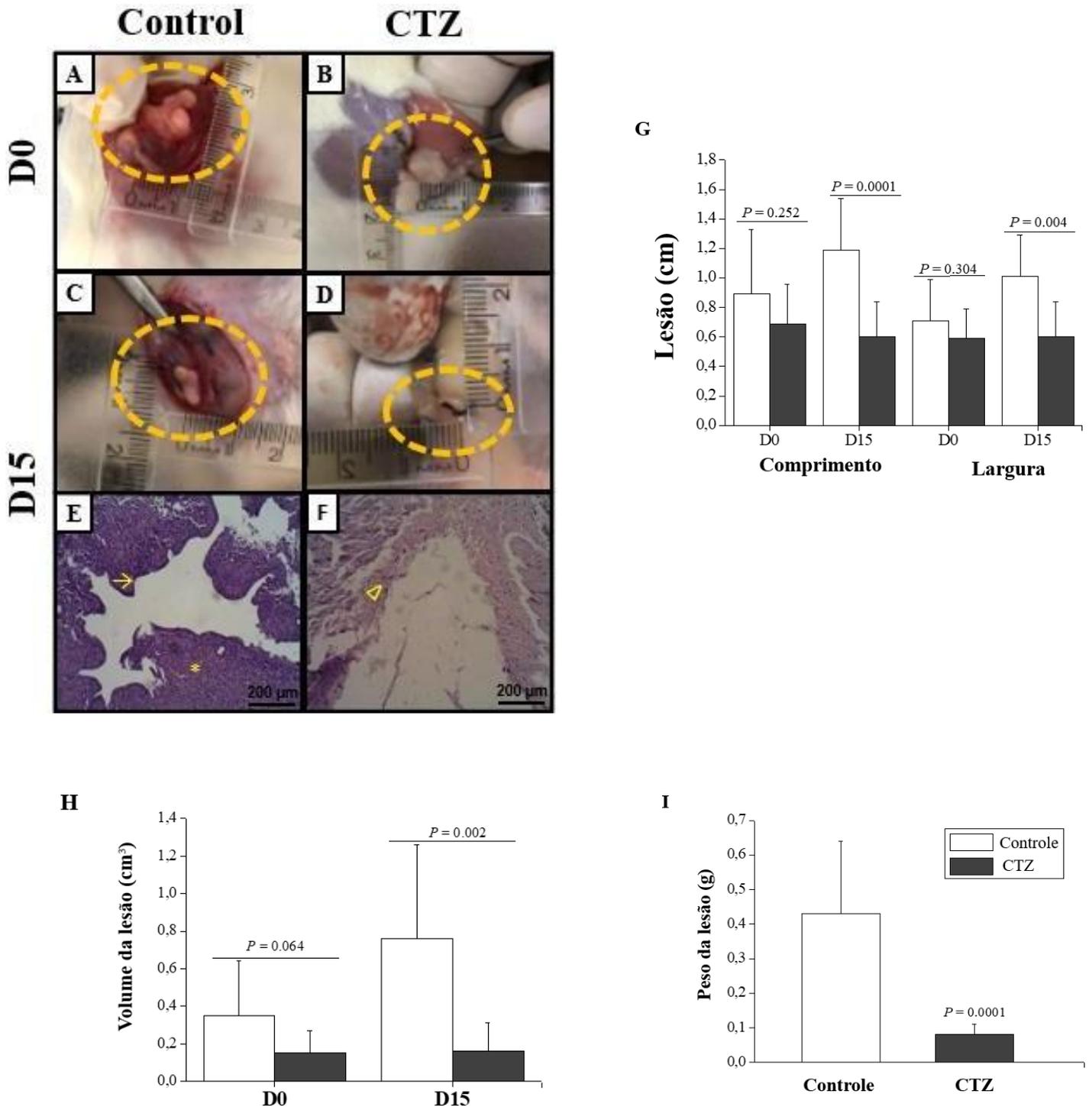
## 5- RESULTADOS

### 5.1. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre as lesões endometrióticas em ratas Wistar.

Após 15 dias do transplante das lesões endometrióticas, os animais foram anestesiados e submetidos a abertura da cavidade peritoneal para a análise macroscópica (**Figuras 9 A e B**). Após a confirmação do estabelecimento das lesões, iniciou-se o tratamento por 15 dias consecutivos com o clotrimazol 200 mg/kg. Após esse período, uma nova análise macroscópica foi realizada mostrando uma diminuição das lesões nos animais tratados (Figura 9 D) em relação aos animais controles (**Figura 9 C**). Os resultados das análises macroscópicas foram confirmados pelas observações microscópicas das amostras coradas com hematoxilina e eosina. Nos animais controles foram observadas células endometriais e estroma confirmando as lesões (**Figura 9 E**). Já nos animais tratados, observa-se atrofia das células endometriais e a presença de tecido muscular, sendo confirmada a redução das lesões endometrióticas (**Figura 9 F**).

As análises do peso, volume e área da lesão foram corroboradas com a análise macroscópica e microscópica, verificando que houve diminuição da área (Figura 9 G), volume (**Figura 9 H**) e peso (**Figura 9 I**) das lesões tratadas quando comparadas ao grupo controle.

**Figura 9:** Efeito do tratamento do clotrimazol em modelo experimental de endometriose, em relação a análise macroscópica e morfológica das lesões endométricas.



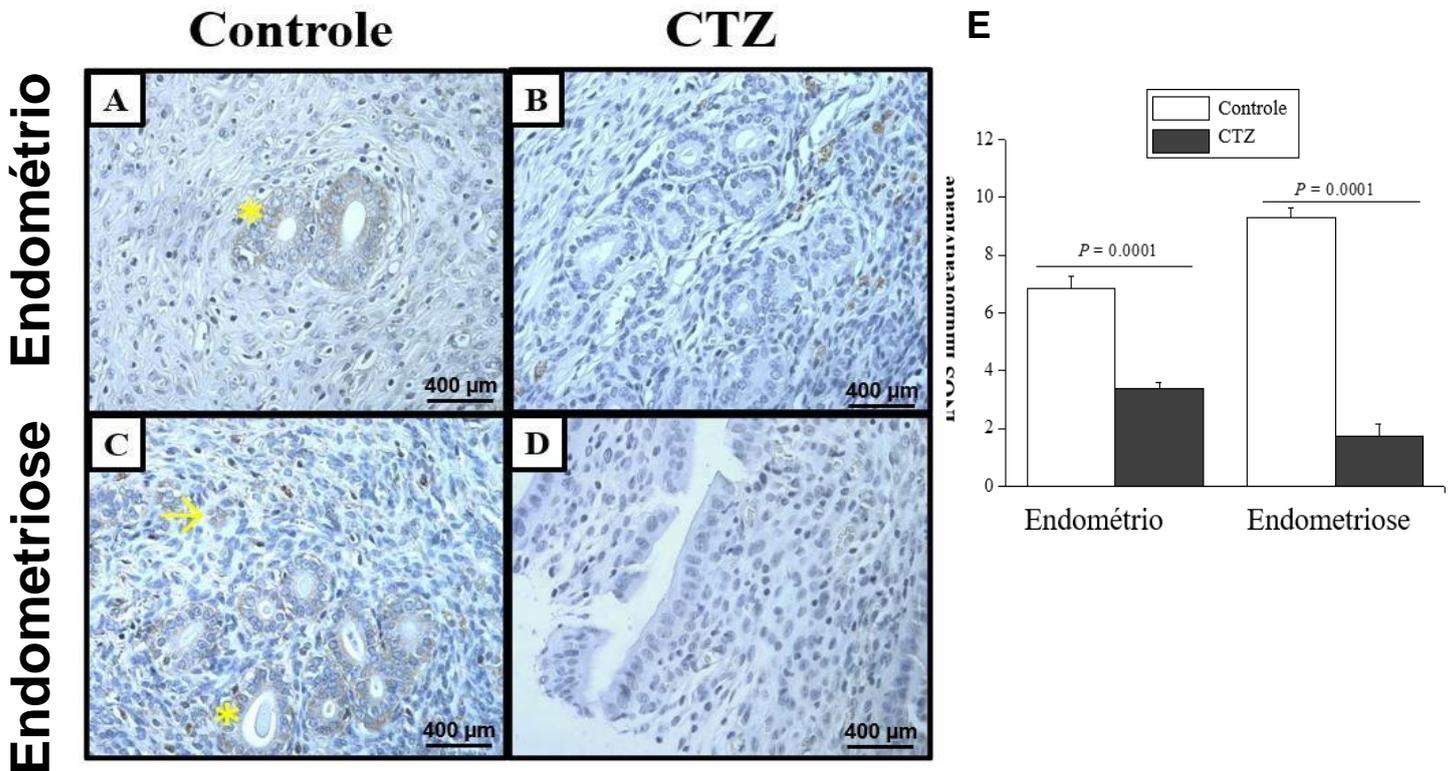
A fotografia A e B, mostrando transplante da endometriose na região peritoneal. Após 15 dias de tratamento com clotrimazol mg/kg, observa-se uma diminuição da lesão (fig. D), quando comparado ao grupo controle (fig. C), que recebeu 3ml de óleo de girassol V.O. O resultado da análise macroscópica foi corroborado com as análises histológicas Fig. E, o grupo controle apresenta glândulas endometriais

(setas) e estroma (\*), nos animais tratados com clotrimazol (fig. F), observa-se a atrofia das glândulas estromais (seta) e tecido muscular. As análises estatísticas de tamanho, volume e peso das lesões (fig. G,H,I), apontam que houve diminuição desses parâmetros em animais tratados com clotrimazol, quando comparados ao grupo controle após 15 dias de tratamento.

## **5.2. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a quantificação de iNOS em tecido endometrial.**

Para a determinação da quantificação de iNOS foram utilizadas amostras histológicas do tecido endometrial e das lesões endometrióticas e aplicada a técnica de imuno-histoquímica. O endométrio do grupo controle (**Figura 10 A**) apresentou maior marcação para iNOS em glândulas, quando comparado ao grupo tratado com CTZ (**Figura 10 B**). Nas lesões endometrióticas, o grupo controle (Figura 10C) apresentou maior marcação e células estromais, quando comparados ao grupo CTZ (**Figura 10 D**). Os dados obtidos através da imuno-histoquímica, foram confirmados em análise morfométrica (**Figura 10 E**), indicando que o tratamento com CTZ após 15 dias, foi capaz de diminuir as marcações de iNOS tanto no endométrio e quanto nas lesões endometrióticas.

**Figura 10:** Efeito do tratamento com clotrimazol na quantificação de iNOS no tecido endometrial com a técnica de imuno-histoquímica.

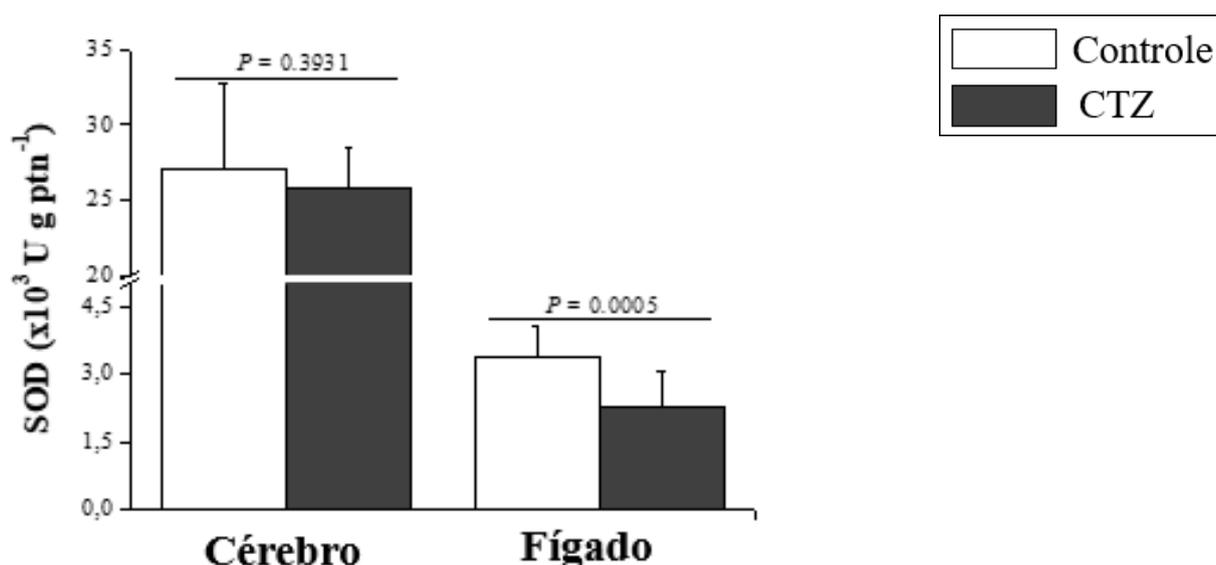


No endométrio, as marcações de iNOs foram evidenciadas em glândulas(\*) (fig. A) nos animais controle e quando tratadas com CTZ (fig. B), houve a diminuição das marcações. Nas lesões endometrióticas, o grupo controle (Fig. C), apresentou maior marcação em glândulas(\*) e estroma (seta), quando comparados ao grupo CTZ (D). Os resultados da imuno-histoquímica, corroboram com os dados obtidos por análise morfométrica (fig. E)

### 5.3. Efeito do tratamento com Clotrimazol sobre a atividade da enzima Superóxido dismutase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

Considerando que o tratamento utilizando o CTZ se mostrou eficaz até o momento, buscou-se compreender a tolerabilidade e segurança desse tratamento, utilizando os tecidos de cérebro e fígado desses animais. Durante o processo inflamatório é produzido  $O_2^-$ , cujo qual é metabolizado a  $H_2O_2$  por ação da enzima SOD. Sendo assim, buscou-se avaliar a atividade da SOD. A **figura 11**, demonstra que no cérebro não houve diferença significativa na atividade da SOD nos animais tratados com CTZ, quando comparados ao grupo controle. No entanto, o tratamento com CTZ foi capaz de reduzir a atividade de SOD no fígado desses animais. Sugerindo que a atividade da SOD exerce um efeito protetivo no fígado dos animais tratados com CTZ.

**Figura 11:** Efeitos do tratamento com antimicótico clotrimazol sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

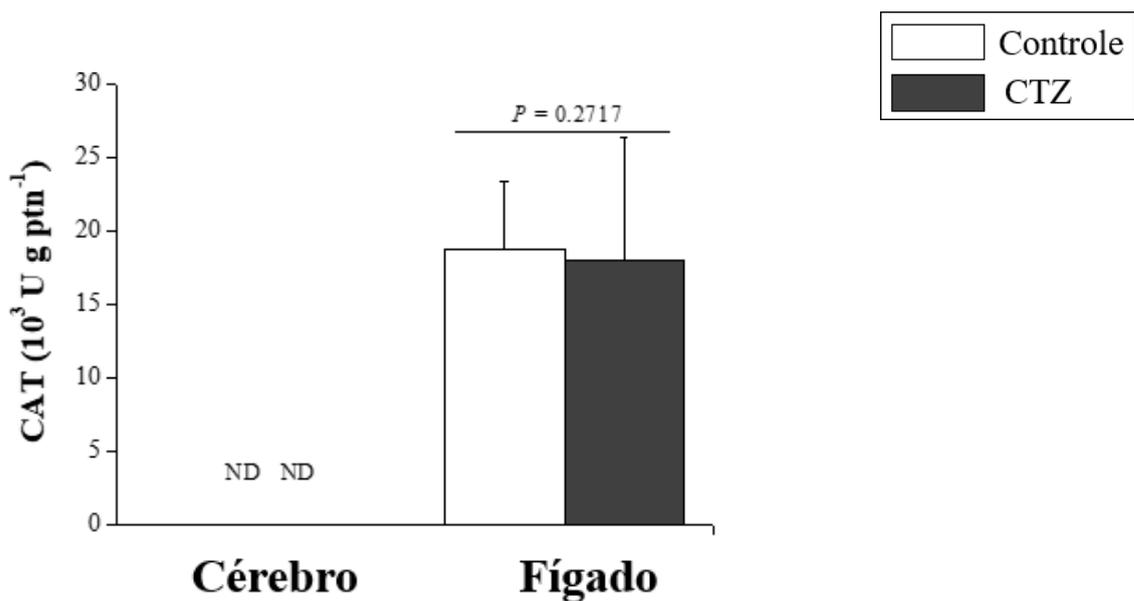


A atividade da enzima foi avaliada através de ensaio bioquímico enzimático, após 15 dias de tratamento consecutivo de CTZ via oral (200 mg/Kg). No fígado, houve a diminuição da atividade de SOD nos animais tratados com CTZ, quando comparados ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa na atividade de SOD no cérebro.

#### 5.4. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da enzima catalase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

A atividade da enzima antioxidante catalase, foi realizada no cérebro e fígado dos animais. De acordo com o gráfico (**Figura 12**), no cérebro não houve quantificação da enzima catalase em ambos os grupos e no fígado houve atividade da enzima CAT, porém não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e tratamento.

**Figura 12:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima catalase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

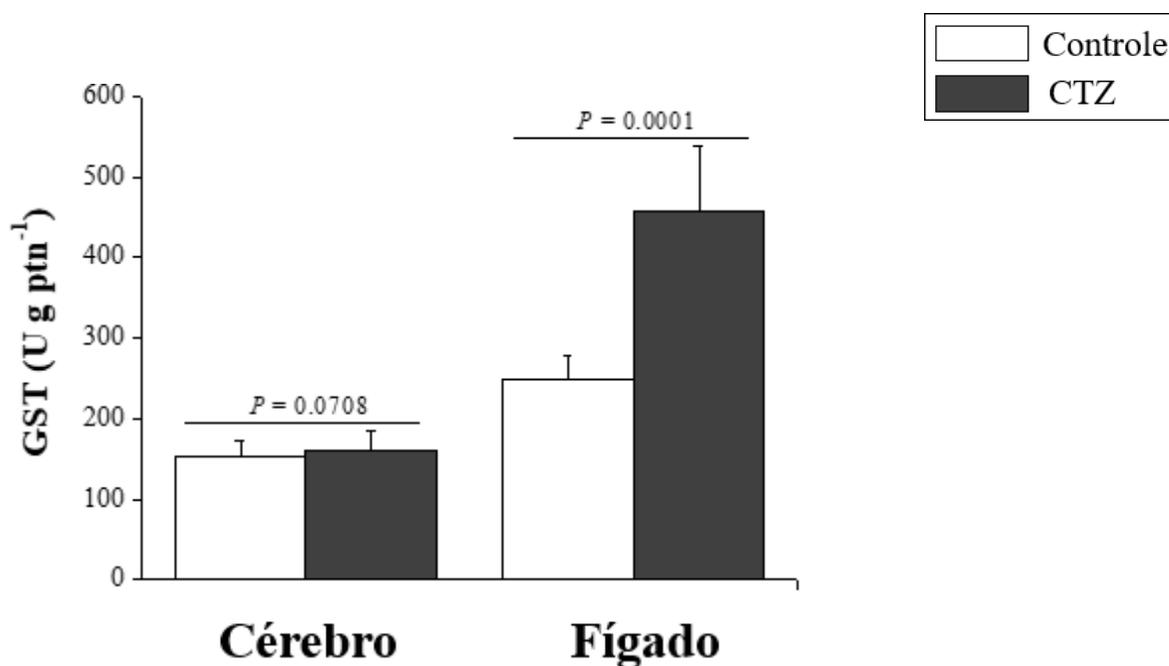


A atividade da enzima foi avaliada através de ensaio bioquímico enzimático, após 15 dias de tratamento consecutivo de CTZ via oral (200 mg/Kg). Não houve diferença significativa no fígado e no cérebro não houve quantificação da atividade de catalase.

### 5.5. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da enzima glutathione S transferase no cérebro e fígado de ratos Wistar em modelo experimental de endometriose.

Tendo em vista que atualmente os medicamentos utilizados na clínica médica para o tratamento e controle dos sintomas da endometriose não se apresentam de forma segura e trazem efeitos adversos significativos, buscamos avaliar a atividade da enzima GST. Conforme o gráfico representado na **figura 13**, no cérebro não houve diferença entre a atividade enzimática em ambos os grupos. Porém, de forma interessante, a atividade da GST aumentou significativamente no fígado de animais submetidos ao tratamento com CTZ quando comparados ao grupo controle.

**Figura 13:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima glutathione S transferase no cérebro e fígado de ratos Wistar em modelo experimental de endometriose.

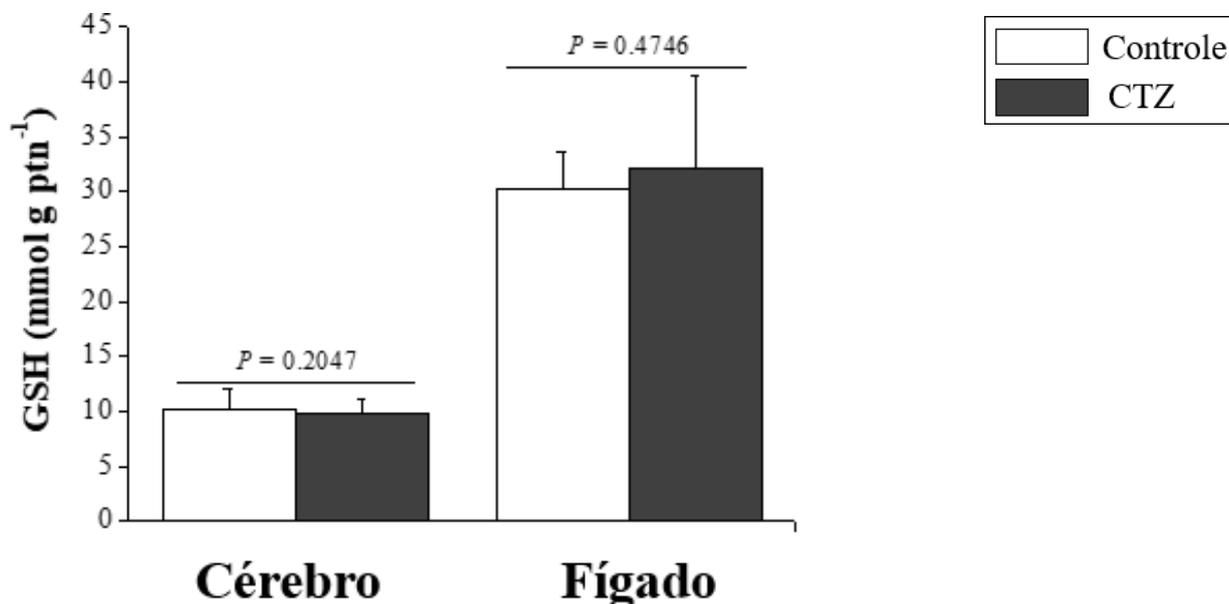


A atividade da enzima foi avaliada através de ensaio bioquímico enzimático, após 15 dias de tratamento consecutivo de CTZ via oral (200 mg/Kg). Não houve diferença significativa no cérebro dos animais. No entanto, no fígado a GST se mostrou em maior atividade em animais tratados com CTZ quando comparados aos grupo controle.

## 5.6. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre a atividade da Glutathione redutase no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

A atividade da GSH foi avaliada uma vez que a enzima possui um papel fundamental na biotransformação e eliminação de xenobióticos. Conforme demonstrado na **figura 14**, no cérebro não houve diferença significativa na atividade da GSH. No entanto, no fígado houve um aumento significativo da atividade de GSH quando comparado ao grupo controle. Assim, os dados obtidos de SH sugerem que o aumento de ambas atividades enzimáticas, contribuem para a diminuição da toxicidade do xenobiótico, aumentando a conjugação de GSH e tornando o fármaco mais solúvel e melhorando a sua eliminação.

**Figura 14:** Efeitos do tratamento com CTZ sobre a atividade da enzima glutathione no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

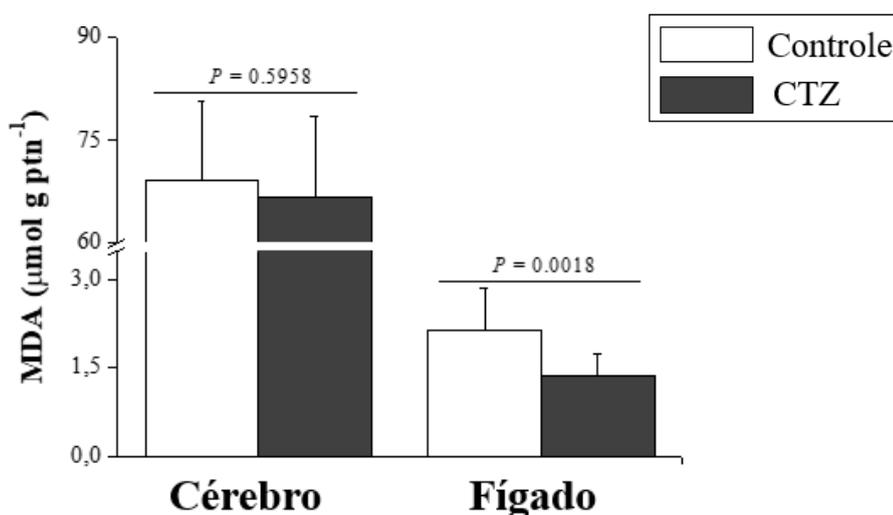


A atividade da enzima foi avaliada através de ensaio bioquímico enzimático, após 15 dias de tratamento consecutivo de CTZ via oral (200 mg/Kg). Não houve diferença significativa no cérebro dos animais. No entanto, no fígado a GSH se mostrou em maior atividade em animais tratados com CTZ quando comparados aos grupo controle.

### 5.7. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de Malondialdeído no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

Após a avaliação das enzimas antioxidantes frente ao tratamento com CTZ, buscou-se avaliar um dos marcadores de dano oxidativo, MDA, produto final da peroxidação lipídica. De acordo com a **figura 15**, no cérebro não houve diferença entre os níveis de MDA, entre os grupos. Entretanto, no fígado os animais tratados com CTZ demonstram uma diminuição nos níveis de MDA quando comparados ao controle. Indicando, que o tratamento com CTZ é capaz de diminuir os danos a nível de membrana plasmática.

**Figura 15:** Efeitos do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

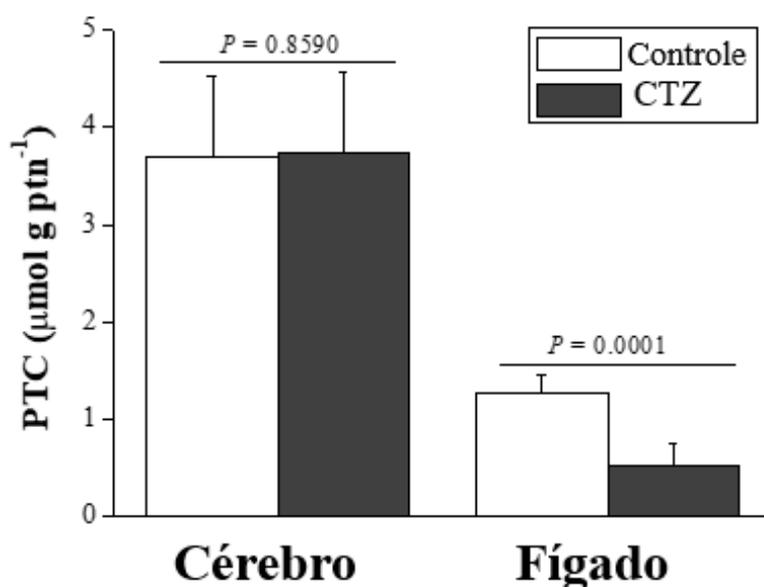


Os níveis de MDA foram quantificados através do método de TBARS. 15 dias após o tratamento consecutivo via oral com clotrimazol (200 MG/kg). Não houve diferença significativa no cérebro. No entanto, no fígado, houve a diminuição dos níveis de MDA em animais tratados com CTZ, quando comparados ao grupo controle.

### 5.8. Efeito do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de Proteína carbonilada no cérebro e fígado de ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

Durante o processo inflamatório são geradas EROs e espécies carboniladas reativas (RCS), que podem causar modificações em proteínas através de oxidação e carbonilação, acarretando em alterações na estrutura e função das proteínas. Conforme o gráfico apresentado na **figura 16**, as amostras de cérebro não apresentaram diferença significativa nos níveis de PTC. No entanto, no fígado houve uma diminuição na presença de PTC em animais tratados com o CTZ, quando comparados ao grupo controle. Os dados obtidos dos ensaios de PTC e dos níveis de MDA, sugerem que o CTZ possui um papel fundamental na diminuição de danos celulares e de proteínas, assim atuando no equilíbrio redox.

**Figura 16:** Efeitos do tratamento com clotrimazol sobre os níveis de pr no cérebro e fígado de proteína carbonilada (PTC) ratas Wistar em modelo experimental de endometriose.

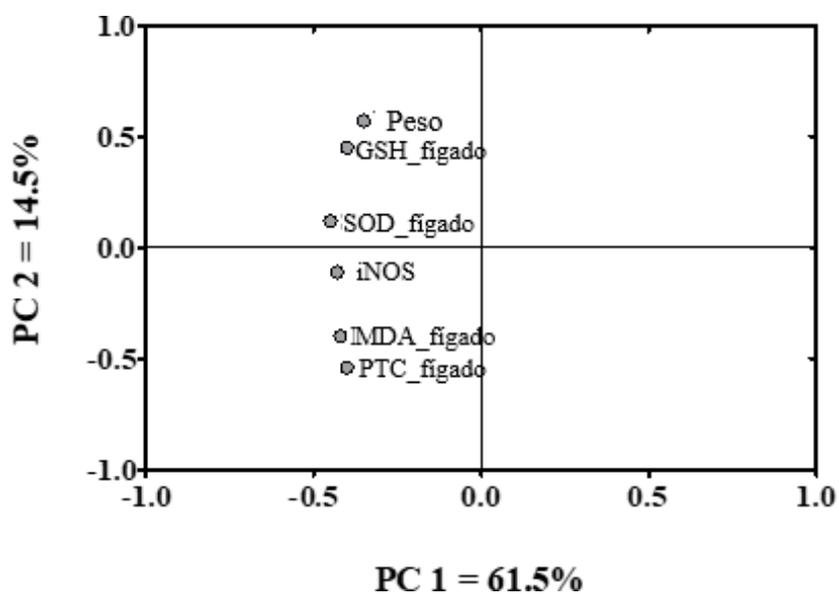


Os níveis PTC foram quantificados através do método colorimétrico adaptado de Mesquita et.al. 2014. Após 15 dias após o tratamento consecutivo via oral com clotrimazol (200 MG/kg). Não houve diferença significativa no cérebro. No fígado, houve a redução de PTC em animais tratados com CTZ, quando comparados ao grupo controle.

## 5.9. Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é uma técnica baseada em multivariação de modelagem da estrutura de covariância. A adequação a técnica foi determinada por KMO , cujo qual obteve um KMO global de 0,75, indicando adequação ao método. Durante a análise individual dos fatores de cada variável CAT obteve um KMO de 0,28 e GST de 0,36. Sendo assim, ambos foram retirados das análises. Por outro lado, a PCA associou as variáveis SOD, GSH, peso, iNOS, MDA e PTC em dois componentes principais, compartilhando 76% da variância total. Como demonstra a figura 17, houve uma associação forte e positiva entre SOD e GSH ( $r=0,75$ ), enquanto SOD e iNOS, apresentou-se como uma associação moderada ( $r=0,68$ ), sugerindo que entre os biomarcadores de estresse oxidativo e iNOS, apresentam uma correlação específica entre as respostas antioxidantes e inflamatórias em pacientes com endometriose. E a associação entre MDA e PTC ( $r=0,71$ ), se apresentou forte e positiva, esse resultado sugere que os subprodutos de LPO podem estar contribuindo para a carbonilação de proteínas. Sendo assim, esse efeito pode contribuir para a intensificação das respostas do sistema imunológico, uma vez que foram observadas correlações moderadas entre iNOS, MDA e PTC.

**Figura 17.** Análise de componentes principais (PCA)



Os parâmetros obtidos de peso, GSH,SOD,iNOS, MDA e PTC, utilizando apenas fígado. O fator de adequação de Kaiser- Meyer- Olkin (KMO), apresentando média global de 0,75. A correlação foi realizada com o Software R versão 3.5.2 e a plotagem gráfica foi realizada com o programa GraphPad Prism.

## 6. Discussão

As mulheres que tem a endometriose são impactadas na vida pessoal, social e profissional, devido aos sintomas associados a doença e a baixa eficácia dos tratamentos atuais, se tornando um problema de saúde pública. Estima-se que ocorram anualmente 51.000 internações hospitalares em decorrência a complicações da endometriose e a incidência anual da doença está entre 1,4 a 3,5 mil. Assim, gerando um alto custo em saúde pública (GUEDES *et.al.*,2021).

O modelo experimental que utilizamos recebeu o tratamento de 200 mg/kg de CTZ por via oral por 15 dias consecutivos. A dose de escolha foi baseada em estudos anteriores, que não apresentou nenhuma reação adversa considerável, variação de parâmetros hepáticos ou sanguíneos. E baseado em experimentos anteriores, o óleo de girassol que utilizamos como veículo do CTZ e administrado no grupo controle não tem efeito sobre as lesões endometrióticas ( MACHADO *et al.* 2018, MACHADO *et.al.*,2020).

Atualmente,os medicamentos e a laparoscopia utilizando na clínica médica são ineficientes no tratamento da doença e possuem efeitos adversos significativos. Por esse motivo, nesse projeto avaliamos a segurança e a tolerabilidade do CTZ, uma vez que esse medicamento possui poucos efeitos adversos, de baixo custo e se mostrou eficaz no tratamento da endometriose em modelo experimental. Anteriormente, foi descrito pelo grupo que o CTZ foi capaz de impedir o crescimento das lesões endometrióticas, reduzindo o VEGF e VEGF-2. Esses fatores desempenham um papel fundamental na angiogênese da endometriose peritoneal (MACHADO,*et.al.* 2018). O VEGF é um fator angiogênico importante na progressão da endometriose, aumentando a proliferação celular, permeabilidade vascular e migração celular, esse fator é secretado pelas células estromais eutópicas e ectópicas, pelos macrófagos peritoneais presentes durante o processo inflamatório (GAZVANI & TEMPLETON,2002, LI *et.al.* 2020,ARABLOU *et.al.*,2021). Outro fator importante para o desenvolvimento das lesões endometriais é a proteína quinase B (AKT), envolvida na proliferação celular (HUNG,*et.al.*2021). Mas, em estudos prévios realizados pelo grupo, demonstrou que o tratamento com CTZ foi capaz de diminuir a expressão de AKT (MACHADO *et.al.*,2018) Esses fatores, explicam a diminuição das lesões

endometriose quando administrado o CTZ. Além disso, a fosforilação do PERK que possui um papel no estresse oxidativo.

Outro fator importante para a progressão da doença são os altos níveis de estrogênio. O CYP450 aromatase (CYP19A1), catalisa a conversão de testosterona e androstenediona para estradiol e estrona, elevando a produção de estrogênio. Já foi descrito pelo grupo anteriormente que o tratamento com CTZ é capaz de regular negativamente a via da aromatase, diminuindo os níveis de estrogênio (MACHADO, *et al.* 2020). Em outro estudo *in vitro*, avaliou quatro classes de antimicóticos imidazólicos, sendo eles o CTZ, miconazol, cetoconazol e fluconazol. O estudo apontou que o CTZ foi capaz de inibir a CYP19A1, bem como se mostrou como o único medicamento capaz de diminuir de esteróides e resultando no completo desligamento da síntese de estrogênio (MUNKBOEL, *et al.* 2019).

Durante o processo inflamatório ocorre a ativação de macrófagos que aumentam a expressão da iNOS e a produção de ON, sendo um dos fatores que contribuem para a evolução e as complicações da endometriose, como a desregulação menstrual, problemas associados a ovulação, manutenção da gravidez e implantação embrionária (MAUL *et al.*, 2003, XIU-LI Y *et al.* 2009). Esses marcadores atuam como mediadores do processo inflamatório e da angiogênese (FUKUMURA *et al.* 2001; KORHONEN *et al.* 2005). Por outro lado, o sistema antioxidante neutraliza a geração de ROS. No entanto, caso ocorra um desequilíbrio entre o sistema oxidante-antioxidante gera no desequilíbrio redox (Dai *et al.*, 2021). Por esse motivo, foi feita a marcação de iNOS no tecido endometrial por imuno-histoquímica e observamos que quando tratado com CTZ, ocorreu a diminuição da marcação de iNOS no endométrio e na lesão endometriótica. Sugerindo que o tratamento com CTZ é eficaz em balancear o sistema oxidante-antioxidante, suprimir a manutenção e o crescimento da lesão endometriótica.

A condição de endometriose favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (MACHADO *et al.*, 2018). Para avaliar a tolerabilidade farmacológica do CTZ, utilizamos o cérebro e o fígado dos animais submetidos ao modelo experimental de endometriose, uma vez que a patologia é considerada uma doença sistêmica, que afeta principalmente a região pélvica e afeta o metabolismo do fígado e do tecido adiposo, levando a uma inflamação sistêmica e alteração da expressão gênica no

cérebro, ocasionando dor e alterações de humor (TAYLOR *et.al.*,2021). A SOD é um grupo de metaloenzimas, que atuam na primeira linha de defesa contra danos causados por ROS e desempenha um papel fundamental no tratamento de doenças inflamatórias, como a endometriose (ARABLOU *et.al.*,2021, ZHAO, *et.al.*2021). A SOD é uma enzima antioxidante que atua dismutando  $O_2^-$ , transformando em  $H_2O_2$ , evitando o acúmulo de uma ROS mais deletéria que o  $H_2O_2$  (SALES JUNIOR *et al.*, 2021). No fígado o CTZ foi capaz de diminuir a sua atividade comparando ao grupo controle, sugerindo que o tratamento exerce um efeito protetivo na produção de  $O_2^-$  .

Corroborando com o resultado obtido da atividade de SOD, ocorreu um aumento significativo de GST no fígado dos animais tratados com CTZ. O mesmo foi observado por Dadali (2000), que quantificou um aumento da atividade de GST em 91% no fígado de ratos, quando administrado 200 mg/kg de CTZ. O aumento da atividade de GST no fígado do grupo tratado com CTZ está diretamente associado a uma ação desintoxicante do organismo. O CTZ aumenta a atividade das subunidades das isoenzimas de GST presentes nos hepatócitos e do CYP450. Ação esta já esperada, pois o fígado exerce uma função no metabolismo de xenobióticos (GONZÁLEZ *et.al.* 1998). O aumento da atividade de GST induzido pelo tratamento com CTZ, pode explicar o aumento da atividade de GSH no fígado de animais tratados com CTZ, uma vez que a enzima diminui a toxicidade do fármaco e aumenta a conjugação de GSH, tornando em mais solúvel em água, substratos menos tóxicos e aumentando as taxas de excreção.

A peroxidação lipídica é uma das vias do estresse oxidativo e o MDA é um dos produtos dessa peroxidação, sendo considerado um marcador para avaliação de lesão celular e estresse oxidativo. Uma vez que a geração de peroxidação lipídica está diretamente relacionada a uma produção excessiva de ROS ou a uma deficiência de defesa antioxidante (AL-SHEBLY & MANSOUR,2012). Observamos que nos animais tratados com CTZ, ocorreu uma diminuição dos níveis de MDA. Outro excelente biomarcador para danos que envolvem proteínas são as PTC's , uma vez que as proteínas são os principais alvos para dano oxidativo (DALLE-DONE *et.al.* 2003, DALLE-DONE,2006). Observamos que no fígado há uma diminuição da presença de PTC em animais tratados com CTZ. Esses dados sugerem que o tratamento com CTZ regula do desequilíbrio redox e exerce um efeito protetivo a danos hepáticos.

A análise de PCA mostrou uma associação forte e positiva entre as enzimas SOD e GSH, sugerindo que a GSH promoveu a quebra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pela SOD na dismutação de -O<sub>2</sub> (SALES JUNIOR *et al.*, 2022, 2021). O aumento de GSH no fígado, pode ser explicado pela alta atividade de GST, uma vez que esta enzima utiliza o grupamento tiol da GSH, para aumentar a conjugação de xenobióticos, tornando mais solúveis em água e menos tóxicos (SATO *et al.*, 2004). A análise permitiu observar uma associação moderada entre SOD e iNOS, sugerindo que ocorre o aumento do sistema antioxidante em relação à formação de ROS gerando um aumento da resposta do sistema imunológico. O estresse oxidativo tem um papel relevante na progressão da endometriose e resultando em respostas inflamatórias (SAMIMI *et al.*, 2019; SIRACUSA *et al.*, 2021).

A PCA apontou uma associação forte e positiva entre os marcadores oxidantes MDA e PTC, sugerindo que os subprodutos da peroxidação lipídica podem contribuir para a carbonilação de proteínas (FURUTA *et al.*, 2012). E a correlação moderada entre a iNOS, MDA e PTC, sugerem que esse efeito pode contribuir para o aumento das respostas do sistema imunológico. Sendo assim, o tratamento com CTZ, se mostrou eficaz, seguro e tolerável para o tratamento da endometriose. Sendo um medicamento de baixo custo, fácil acesso e conhecido na clínica médica (MACHADO *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2020)

## **7. Conclusões**

A partir dos resultados obtidos, o clotrimazol foi capaz de reduzir a lesão endometrial, diminuir a quantificação de iNOS, tanto no endométrio quanto na endometriose. Aumentou a ação das enzimas antioxidantes no fígado dos animais tratados e diminuiu os biomarcadores de danos celulares e de proteínas. Assim, sugerindo que o CTZ atua no equilíbrio redox, exerce um efeito protetivo no fígado, se mostra menos tóxico e tolerável. Sendo assim, o CTZ se torna um potencial fármaco para o tratamento da endometriose, se mostrando seguro, de baixo custo e com poucos efeitos adversos.

## 8.Referência bibliográfica

AL-SHEBLY MM; MANSOUR MA. **Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in diabetic and hypertensive women during labor.** Oxidative medicine and cellular longevity.v.2012, p. 1-6, 2012.

ALMAZROO, O.A.; MIAH,M.K.;VENKATARAMANAN,R. **DRUG METABOLISM IN THE LIVER.** Clin. Liver. Dis. v.21, n.1, p1-20,2017

ALOTAIBI, F. T.; PENG, B.; KLAUSEN, C. **Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endometriosis.** PLOS ONE, v. 14, n. , 2019.

ANDRES, M. P.; MENDES, P. F. R.; HERNANDES, C.; **Hormone treatment as first line therapy is safe and relieves pelvic pain in women with bowel endometriosis.** Einstein (Sao Paulo, Brasil), v. 17, n. 2, 2019.

AMINI,L.;CHEKINI,R.;NATEGHI,M. R. ;HAGHANI,H.; JAMIALAHMADI, T.; SATHYAPALAN, T.; SAHEBKAR, A. **The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis: A Randomized, Triple-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial.** Pain Research and Management p 1-6,2021.

ARABLOU,T. ARYAEIAN,N.;KHODAVERDI,S.; KOLAHDOUZ-MOHAMMADI, R.; MORADI,Z.;RASHIDI,N.;DELVANDI,A. **The effects of resveratrol on the expression ofVEGF, TGF- $\beta$ , and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis.** Scientific Reports v.11 n.6054, 2021

BELLELIS, P. DIAS, J.A.; PODGAEC, S.;GONZALES, M.; BARACAT,E.C.; ABRÃO,M.S. **Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica - uma série de casos.** Rev. Assoc. Med. Bras.; v. 56, p.467-471, 2010

BICALHO,K,M.; **AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO HEPÁTICO: do nascimento à vida adulta.** Dissertação. Pós graduação em biologia celular. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p.1-92, 2019

BIRDEN, E.; SAHINER,U.M.; SACKESEN,C.;ERZURUM,E.;KALAYCI,O. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense.** World allergy organization. Nº5, p. 9-19, 2012.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST.A. **Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease.** Eur. Respir. Jour. v.22 p 1-27, 2003

BULUN,S.E.;YILMAZ,B.D.;SISON,C.;MIYAZAKI,K.;BERNARDI,L.;LIU;S.;KOHMEIER ,A.;YIN,P.MILAD,M.;WEI,J. **Endometriosis.** Endocr. Rev. v. 40 p. 1048 – 1079, 2019

CHO, Y. S.;MOON, H.B. **The Role Of Oxidative Stress in the Pathogenesis of asthma.** J.Allergy Asthma immunol. Nº 2,p. 183-187,2010

CLOTRIMAZOL [BULA] .São Paulo. EMS S/A. Disponível em: <[https://www.ems.com.br/arquivos/produtos/bulas/bula\\_clotrimazol\\_10040\\_1289.pdf](https://www.ems.com.br/arquivos/produtos/bulas/bula_clotrimazol_10040_1289.pdf)>. Acesso em: 12 de março de 2022.

COSTA,H.M. **A influência das fases do ciclo menstrual no treinamento de força em mulheres que não utilizam anticoncepcionais.** Monografia Especialização-Curso Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Paraná,p. 1-33, 2014.

CROWLEY, P. D.; GALLAGHER, H. C. **Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future.** Journal of Applied Microbiology, v.117, n.3, p.611–617, 2014.

DAI, X.; WANG D.; ZHANG, J. **Programmed cell death, redox imbalance, and cancer therapeutics.** Apoptosis. v.7 n.8 , p. 385-414, 2021.

DADALI,V.A.;GOLOVANOVA,N.E.;PAVLOVA,R.N.;DZHANGULOVA,N.E.;VINOGRADOVA,V.E. **Corrective effect of clotrimazole and beta-ionol during exposure to thiophenol.** Bull Exp. Biol. Med. n.130, v.11,p. 1090-1092, 2000.

DALLE-DONNE, I; GIUSTARINI,D.; COLOMBO,R.; ROSSI, R.; MILZANI,A.**Protein carbonylation in human diseases.** Trends in Molecular Medicine, v. 9, p. 169-176, 2003.

DALLE-DONNE,I.; ALDINI,G. CARINI,M.; COLOMBO,R.;ROSSI,R.;MILZANI,A. **Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.** Jour. of Cell. and Mol. Med., v. 10, p. 389-406, 2006.

DIAS, I.; SIMÃO, R.; NOVAES,J; **Efeito das Diferentes Fases do Ciclo Menstrual em um Teste de 10 RM,** Fitness & Performance Journal, v. 4, n. 5, p. 288-292 ,2005

DONG, S.; ZHANG, J.; ZHAI, F.; *et al.* **Comparative efficacy and safety of**

**traditional Chinese patent medicine for endometriosis.** *Medicine*, v.98, n.29, 2019.

DUARTE, H.E.; **Anatomia Humana** , Universidade Federal de Santa Catarina, ed.1, 175 p.,2014

DOZOR,Allen J., **The role of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma.** *Ann.N.Y.Acad.Sci.* n 1203, p. 133-137, 2010.

FERREIRA,A.L.A; MATSUBARA,L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Ass. Med. Brasil.* n.43, vol.1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA,P. G. ;**Novas estratégias terapêuticas para o tratamento de esporotricose.** Tese Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal Fluminense , Niterói,p.1-223, 2019.

FITZGERALD,H.,SCHUST,D.; SPENCER,T. **In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women's health.** *Biol.Reprod.* v.104 n.2, p. 282–293, 2021

FOURQUET, J.; SINAIL, N.; STRATTON, P.; *et al.* **Characteristics of women with endometriosis from the USA and Puerto Rico.** *Journal of endometriosis and pelvic pain disorders.* v.7, n.4, p.129–135, 2015.

Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun C.O., Buerk D.G., Huang P.L., Jain R.K.; **Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*n. 98, p. 2604–2609,2001.

FURUTA, A., SUZUKI, Y., HAYASHI, N., EGAWA, S., YOSHIMURA, N. **Transient receptor potential A1 receptor-mediated neural cross-talk and afferent sensitization induced by oxidative stress: Implication for the pathogenesis of interstitial cystitis/bladder pain syndrome.** *Int. J. Urol.* n.19, p.429–436, 2012

GAZVANI,R.; TEMPLETON,A. **Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis.** *Reprod.* v.123 n.2 p.217-226 ,2002

GELONE P. S.; GENNARO A. R. Remington: **Science and Practice of Pharmacy.** by Troy DB, Lippincott Williams & Willkins, Baltimore. 2006.

GUEDES, H.H.;BEZERRA,A.M.F; SILVA,E.N.;LEITE,E.S.; GRANJEIRO,W.R.O.; BEZERRA,K.K. **Hospitalizations for endometriosis in brazil (2010-2019): Ecological study.** Temas em saúde. v.21,n.6.2021

GONZÁLEZ,P.; TUÑÓN M.J.;MANRIQUE,V.; GARCIA-PARDO , L.A.; GONZÁLEZ, J. **Changes in hepatic cytosolic glutathione s-transferase enzymes induced by clotrimazole treatment in rats.** Clin. and Exper. Pharm. and Physi. n.16 p.867-871,1998

GONZÁLEZ-RAMOS, R., VAN LANGENDONCKT, A., DEFRÈRE, S., LOUSSE, J.-C., METTLEN, M., GUILLET, A., ... DONNEZ, J. ; **Agents blocking the nuclear factor- $\kappa$ B pathway are effective inhibitors of endometriosis in an in vivo experimental model.** Gynecologic and Obstetric Investigation, v.65,p. 174–186, 2008

HIDARI, T.; HIRATA, T.; ARAKAWA, T.; *et al.* Contralateral ovarian endometrioma recurrence after unilateral salpingo-oophorectomy. **BMC women's health**, v.19, n.1, p.59, 2019.

HUNG.S.W.;ZHANG,R; TAN.Z.; CHUNG, J.P.W.;ZHANG,T.;WANG,C.C. **Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: A review.** Med. Res. Rev. v.41 n.4, p. 2489-2564,2021

ILESANMI,Abiodun O.;HAWKINS, Denise A.;LESSEY,Bruce A.; **Immunohistochemical Markers of Uterine Receptivity in the Human Endometrium.** Microscopy and Research. And. Technique. Vol.25. P.208-222,

JOSHI, N. R.; MIYADAHIRA, E. H.; AFSHAR, Y.; JEONG,J.W; YOUNG,S.L.;LESSEY,B.A.;SERAFINI,P.C.;FAZLEABAS,A.T. **Progesterone Resistance in Endometriosis Is Modulated by the Altered Expression of MicroRNA-29c and FKBP4.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism, v.102, n.1, p.141–149, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

KAPONIS, A.; WABE, T.; TANIGUCHI, F.; ITO,M.; DEURA,I.; DECAVALAS,G.; HARADA,T. **The role of NF-kappaB in endometriosis.** Frontiers in Bioscience. v.4, p. 1213–1234, 2012

KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A.; **Farmacologia básica e clínica.** Artmed, 12<sup>o</sup> ed. Porto Alegre, 2014.

KHORRAM O. ; LESSEY B.A.; **Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and alpha(v)beta(3) integrin in women with endometriosis.** Fertil Steril. v.78 , n.4, p.860-864,2002.

KOBAYASHIA, H.;KIMURAA,M.;MARUYAMAA.S.;NAGAYASUA,M. **Revisiting estrogen-dependent signaling pathways in endometriosis: Potential targets for non-hormonal therapeutics.** Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. v.258 p.103-110,2021

KORHONEN R., LAHTI A., KANKAANRANTA H., MOILANEN E. **Nitric oxide production and signaling in inflammation.** Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. n. 4, p.471–479,2005.

KOURY,J. C.; DONANGELO, C. M.; **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.** Rev. Nutr., n 16,v:4, p. 433-441, 2003.

LEE,I-TA; YANG,CHUEN-MAO. **Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators induced airway and pulmonary diseases.** Bioche. pharmaco. v 84, p. 581-590, 2012

LI, W.N.; HSIAOB,K.Y.; WANGC,C.N. ; CHANGD,N.; HSUD,P.L.; SUNE,C.H. WUF, S.R.; WUD, M.H.; TSAI, S.J. **Extracellular vesicle-associated VEGF-C promotes lymphangiogenesis and immune cells infiltration in endometriosis.** PNAS Latest Articles.p.1-10, 2019.

LI,W.N.;HSIAO,K.Y.;WANG,C.A.;CHANG,N.HSU,P.L.;SUN,C.H.;WU,S.R.;WU,M.H.; TSAI,S.J. **Extracellular vesicle-associated VEGF-C promotes lymphangiogenesis and immune cells infiltration in endometriosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA.v.117 n.41 p. 25859-25868,2020

LIN,X.;DAI,Y.;TONG,X.; XU,W.;HUANG, Q.; JIN, X.;LI. C.; ZHOU,F.; ZHOU, H. ; LIN, X.;HUANG, D.;ZHANG, S. **Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility.** Redox Bio. v.30. p 1-13,2020

LIU, S.; XIN, X. ; HUA, T.; SHI, R.; CHI, S.; JIN, Z.; WANG, H. **Efficacy of Anti-VEGF/VEGFR Agents on Animal Models of Endometriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis.** s. PLoS ONE.v.17, p. 1-15, 2016

MABIEB,E.; WILHELM,P.; MALLAT,J. **Anatomia Humana.**7ªed. São Paulo.Pearson Education,2014.

MACHADO, D.; PERINI, J.A; MENDONÇA, E. M.; BRANCO, J. R.; BAPTISTA, K. C. R.; PERINI, J. AI.; NETO, J. M. E.; SANTOS, T. Alves; COELHO, W. S.a; NASCIUTTI, L. E.; SOLA-PENA, M.; ZANCAN, P. **Clotrimazole is effective for the regression of endometriotic implants in a Wistar rat experimental model of endometriosis.** Mol. and Cell. Endocrinology.2018

MACHADO, D.; PERINI, J. A.; MENDONÇA, E. M.; CLAUDINO, M. C.; NASCIUTTI, L. E.; SOLA-PENA, M.; ZANCAN, P.; PERINI, J. A. **Clotrimazole reduces endometriosis and the estrogen concentration by downregulating aromatase.** Reproduction and Fertility. v.159, p. 779–786. 2020

MACNEE,W.; **Oxidative stress and lung inflammation in airways disease.** Europ. Journ. Of Pharmaco. n 429, p.195-207, 2001.

MARTI,F.H.; OBER,W.C. BARTOLOMEW,E.F.; NATH, J.L. **Anatomia e fisiologia humana: Uma abordagem visual.** Pearson Education do Brasil,1ª ed. São Paulo,p. 768,2014

MAUL, H., LONGO, M., SAADE, G.R., GARFIELD, R.E.**Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery.** Curr. Pharm. v. 9, p.359–380,2003

MOREIRA, Maria Inês. **Azóis: Farmacologia e Interações.** Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto,2010

Munkboel C.H.; Rasmussen T.,B.; Elgaard C.; Olesen M.K.; Kretschmann A.C.; Styrrishave B. **The classic azole antifungal drugs are highly potent endocrine disruptors in vitro inhibiting steroidogenic CYP enzymes at concentrations lower than therapeutic Cmax.** Toxicology. v.425, p.1-10,2019

OTA, H.; IGARASHI, S.; TANAKA, T. **Xantina oxidase no endométrio eutópico e ectópico na endometriose e adenomiose.** Fertil Steril. n 75:p 785–790,2001

PARASAR, P.; OZCAN, P.; TERRY, K. L. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. **Current obstetrics and gynecology reports**, v.6, n.1, p.34–41, 2017.

PIRES, K.M. et al. **Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance.** *Toxicology in vitro* n.26, p. 791-798, 2012.

ROACH, M. K.; ANDREOTTI, R. F. . **The Normal Female Pelvis.** *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v.60, p.3–10, 2017

ROLLA, E. **Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment.**, *F1000 Faculty Res.* v.8, p.1-28, 2019.

RUIZ, C.R.; **Anatomia humana básica: Para estudantes da área da saúde.** 3 ed. Difusão Editora, São Paulo, 2017.

RUSH, G.; MISAJON, R.; HUNTER, J. A.; *et al.* **The relationship between endometriosis-related pelvic pain and symptom frequency, and subjective wellbeing.** *Health and Quality of Life Outcomes*, v.17, n.1, p.123, 2019.

SALES JUNIOR, S.F., COSTA AMARAL, I.C., MANNARINO, C.F., HAUSER-DAVIS, R.A., CORREIA, F.V., SAGGIORO, E.M.; **Long-term landfill leachate exposure modulates antioxidant responses and causes cyto-genotoxic effects in Eisenia andrei earthworms.** *Environ. Pollut.* v.287, n.117351, 2021

SALES JUNIOR, S.F., DA SILVA, E.O., DE FARIAS ARAUJO, G., SOARES, L.O.S., PARENTE, C.E.T., MALM, O., SAGGIORO, E.M., CORREIA, F.V.; **Antioxidant system alterations and biological health status of earthworms following long-term exposure to antibiotic-contaminated poultry litter.** *Environ. Sci. Pollut. Res.* n.29, p.23607–23618, 2022.

SAUNDERS, P.T.K; HORNE, A.W. **Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects.** *Cell*, n.184 v.11, p. 2807–2824, 2021.

SAHINER, Umit M; BIRDEN, E.; ERZURUM, S.; SACKESSEN, C.; KALAYCI, O. **Oxidative Stress in Asthma.** *World Allergy Organization.* N°4, p. 151-158, 2011.

SAMIMI, M.; POURHANIFEH, M.H. ; MEHDIZADEHKASHI, A.; EFTEKHAR, T.; ASEM, Z. **The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis**

**in the pathophysiology of endometriosis: Basic science and new insights based on gene expression.** J Cell Physiol; v.234 n.11 ;p .1–9, 2019.

SATO EF, NAKAGAWA E, HIRAMOTO K, YAMAMASU S, MORIYAMA-SHIMAMOTO I, INOUE M. **Oxidative stress promotes the regression of fetal liver hemopoiesis.** Biochemistry , v.69 n.1 ,p 18-22 ,2004

SCUTIEIRO,G.; LANNONE, P.; BERNARDI, G.; BONACCORSI, G.; SPADARO, S.; VOLTA, C. A.; GRECO, Pa.; NAPPI, L. **Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity v.17, p. 7 , 2017

SHIGESI, N.; KVASKOFF, M.; KIRTLEY, S.; *et al.* The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, v.25, n.4, p.486–503, 2019.

SIRACUSA, R., D'AMICO, R., CORDARO, M., PERITORE, A.F., GENOVESE, T., GUGLIANDOLO, E., CRUPI, R., IMPELLIZZERI, D., CUZZOCREA, S., FUSCO, R., DI PAOLA, R. **The Methyl Ester of 2-Cyano-3,12-Dioxooleana-1,9-Dien-28-Oic Acid Reduces Endometrial Lesions Development by Modulating the NFkB and Nrf2 Pathways.** Int. J. Mol. Sci. v.3991,n.22 ,2021.

SOUSA,A.I.;ABOBRINHA,N.;PEYRE,L.;GUGENHEIM,J.;RAHMANI,R.  
**CLOTRIMAZOLE PROTECTS THE LIVER AGAINST NORMOTHERMIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS.** Transpl. Proc. v.41,n.10,p.4099-104,2009

TAYLOR, H.S.;KOTYLAR,A.M.;FLORES,V.A. **Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations.** Lancet. v.27,n.397, p. 839-852,2021

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios da anatomia e fisiologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda,2017

THOMPSON,R.,E.; PREMANANDAN, C.;PUKAZHENTHI,B. .S.;WHITLOCK,B.; **A review of in vivo and in vitro studies of the mare endometrium.** Animal Reprod. Science. v. 222, 2020.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Fisiologia: Níveis hormonais e ciclo menstrual,** disponível em:<<[https://www.ufrgs.br/espmat/disciplinas/midias\\_digitaes\\_II/modulo\\_II/fisiologia2.htm](https://www.ufrgs.br/espmat/disciplinas/midias_digitaes_II/modulo_II/fisiologia2.htm)>> Acesso em: 02 de março de 2022

Universidade de São Paulo. **Aparelho reprodutor feminino**, disponível em: <<https://mol.icb.usp.br/index.php/20-25-aparelho-reprodutor-feminino/>> Acesso em: 05 de dezembro de 2022

VAZIRI,N.D. **Causal Link Between Oxidative Stress, Inflammation, and Hypertension**. Iranian Journal of Kidney Diseases. v.2, n.1, p. 1-10 ,2008.

VERCELLINI,P. VIGANO,P. SOMIGLIANA.E. , FEDELE,L. **Endometriosis: pathogenesis and treatment**. Nat. Rev. Endocrinol,v.10, p. 261-275,2013.

YEO SG, WON YS, LEE HY, KIM YI, LEE JW, PARK DC. **Increased expression of pattern recognition receptors and nitric oxide synthase in patients with endometriosis**. Int. J. Med. Sci. v.10, n.9, p.1199-1208, 2013.

XIU-LI Y, W.; WEN-JUN,C.; HUI-HUA,D.;SU-PING,H.;SHI-LONG,F. **ERB-041, a selective ER $\beta$  agonist, inhibits iNOS production in LPS-activated peritoneal macrophages of endometriosis via suppression of NF- $\kappa$ B activation**. Mol. Immu. v.46, n.11, p.2413-2418,2009.

ZANI, Ana Carolina, **Influência do agente antiangiogênico Bevacizumab em endometriose experimentalmente induzida em ratas**. (Dissertação de mestrado), Universidade de São Paulo,p.2 ,2017.

ZHAO, H.;ZHANG,R.;YAN,X.;KELONG,L. **Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation**. J. Mater. Chem.v.15, n.35 p.6939-6957,2021.

