

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Erika Menezes de Mendonça

Avaliação dos efeitos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose

Rio de Janeiro

2019

Erika Menezes de Mendonça

Avaliação dos efeitos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Jamila Alessandra Perini.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Escorsim Machado.

Rio de Janeiro

2019

Título do trabalho em inglês: Evaluation of the effects of Clotrimazole in experimental model of endometriosis.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

M539a Mendonça, Erika Menezes de.
Avaliação dos efeitos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose / Erika Menezes de Mendonça. -- 2019.
90 f. : il. color.

Orientadora: Jamila Alessandra Perini.
Coorientador: Daniel Escorsim Machado.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2019.

1. Endometriose - terapia. 2. Endometriose – epidemiologia.
3. Clotrimazol. 4. Estrogênios. 5. Inflamação. 6. Angiogênese.
I. Título.

CDD – 23.ed. – 618.1

Erika Menezes de Mendonça

Avaliação dos efeitos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: toxicologia ambiental.

Aprovada em: 28 de junho de 2019.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Célia Yelimar Palmero Quintana
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^º. Dr. Enrico Mendes Saggioro
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^º. Dr. Daniel Escorsim Machado (Coorientador)
Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof^ª. Dra. Jamila Alessandra Perini (Orientadora)
Universidade Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2019

Dedico esse trabalho a Deus, que me deu força, paciência e persistência o suficiente pra chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada somos nada podemos. Absolutamente tudo o que tenho hoje, todas as Graças que a mim foram concedidas, eu agradeço.

Ao meu filho e ao meu marido, muito obrigada! Obrigada por serem meu alicerce, minha família e estarem ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins. Eles são minha força pra seguir em frente, mesmo que enfrente dias difíceis.

A minha mãe, pois se cheguei aonde cheguei hoje, devo a ela que me ensinou a ser uma pessoa digna e de bom caráter! É meu exemplo de mãe, de mulher e de pessoa. Te amo infinitamente.

Ao meu primo Eliandro, que na verdade é meu irmão mais velho. Sem seus conselhos eu não teria conhecimento necessário pra chegar onde estou.

Aos meus amigos de turma, em especial à Juliana Amazonas, que esteve ao meu lado durante todo o curso, me ajudando sempre, me dando força, sem hesitar, principalmente depois da gravidez.

Aos meus amigos dos laboratórios LAPAC e LaPesF, presentes que a UEZO me deu e que levarei para toda a vida! Obrigada por todo apoio e carinho de sempre.

Ao meu orientador, professor Daniel, por todo ensinamento a mim compartilhado e toda a orientação necessária pra que pudesse estar me formando mestre hoje. Muito obrigada também pela excelente recepção em nossas confraternizações e pelo melhor churrasco que já pude experimentar!

Muito obrigada também a minha orientadora, professora Jamila, por toda paciência, esforço e dedicação. Por todo carinho comigo e minha família! Obrigada também pelos “puxões de orelha”, pois sem dúvida, eles fazem de nós pessoas e profissionais melhores.

Obrigada a todos que participaram de alguma forma pra minha formação acadêmica e concretização desse trabalho.

A persistência é o caminho do êxito.

CHAPLIN,1997,118.

RESUMO

A endometriose é uma desordem ginecológica estrogênio e angiogênese dependente caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Os principais sintomas são dor pélvica crônica, dismenorrea, dispareunia e infertilidade. O tratamento da endometriose pode ser cirúrgico ou farmacológico, que é baseado no alívio dos sintomas, provocando efeitos adversos e dificultando a adesão ao tratamento. A busca por novas terapias farmacológicas, que sejam efetivas no tratamento da endometriose torna-se necessária. O clotrimazol (CTZ) é um medicamento antimicótico utilizado no tratamento de *Candida albicans* e outras infecções fúngicas. Seus efeitos antiangiogênicos e sobre a inibição da proliferação de células endoteliais já são descritos na literatura. O CTZ também inibe a aromatase, principal enzima da via de produção do estrogênio. Dessa forma, o objetivo do estudo foi testar o CTZ na endometriose. Foram utilizadas ratas Wistar para estabelecimento do modelo experimental de endometriose, conforme aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle via oral e via intraperitoneal (IP), e tratados via oral e via IP com 0,02g/Kg/dia de CTZ. Após 15 dias de tratamento, realizamos análises macroscópica e histológica das lesões (coloração HE para avaliação a viabilidade da lesão), imunohistoquímica de VEGF e VEGFR-2 (avaliação do perfil angiogênico), ER α e aromatase (avaliação da produção de estrogênio local), citometria de fluxo para avaliar a quantidade de macrófagos ativos (F4/80 e MAC2+), ELISA para VEGF, PGE2, IL-10 (avaliação do perfil inflamatório), ELISA para avaliação dos níveis séricos de estrogênio. Análises hematológica, de função hepática (AST e ALT) e metabólica (glicose e insulina), peso corporal e peso do fígado foram realizadas para avaliação da toxicidade. Observou-se redução das lesões nos animais tratados com CTZ quando comparados aos controles, o que foi confirmado pela análise histológica, indicando atrofia e regressão das lesões. Observou-se uma menor marcação para VEGF, VEGFR-2, ER α e aromatase nos animais tratados comparados aos controles. Houve também redução na quantidade de macrófagos ativos, nas concentrações de VEGF, PGE2 e IL-10 no lavado peritoneal e nos níveis séricos de estrogênio nos animais tratados em comparação aos controles. Sugere-se então que o CTZ apresenta efeitos antiangiogênico, anti-inflamatório e supressor da produção de estrogênio em modelo experimental de endometriose, sem apresentar toxicidade, podendo ser um fármaco promissor no tratamento da doença.

Palavras-chave: Endometriose, Tratamento, Clotrimazol, Estrogênio, Angiogênese, Inflamação.

ABSTRACT

Endometriosis is a gynecological disorder estrogen and angiogenesis dependent characterized by endometrial tissue outside the uterine cavity. The main symptoms are chronic pelvic pain, dysmenorrhea, dyspareunia and infertility. The treatment of endometriosis can be surgical or pharmacological, it bases which on the relief of the symptoms, provoking adverse effects and hindering adherence to the treatment. In this context, the search for new pharmacological therapies effective in the treatment of endometriosis becomes necessary. Clotrimazole (CTZ) is an antifungal medicine used to treat *Candida albicans* and other fungal infections. Its antiangiogenic effects and inhibition of endothelial cell proliferation are already described in the literature. CTZ also inhibits aromatase, the main enzyme in the estrogen production pathway. Thus, the aim of the study was to test CTZ in endometriosis. Wistar rats were used to establish the experimental endometriosis model, as approved by the Ethics Committee on Animal Use. It divided the animals into 4 groups: oral and intraperitoneal (IP) control group, and treated orally and IP group with 0.02 g/kg /day of CTZ. After 15 days of treatment, we performed macroscopic and histological analyzes of the lesions (HE staining for lesion viability evaluation), VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry (evaluation of the angiogenic profile), ER α and aromatase (evaluation of local estrogen production), flow cytometry to test the amount of active macrophages (F4/80 and MAC2 +), ELISA for VEGF, PGE2, IL-10 (evaluation of inflammatory profile), ELISA for the evaluation of serum estrogen levels. Hematologic analysis, liver function (AST and ALT) and metabolic (glucose and insulin), body weight and liver weight tests were performed for toxicity assessment. There was a reduction in lesions in CTZ-treated animals compared to controls, histological analysis confirmed which, indicating atrophy and regression of lesions. It observed lower labeling for VEGF, VEGFR-2, ER α and aromatase in treated animals compared to controls. There was also a reduction in the amount of active macrophages in the concentrations of VEGF, PGE2 and IL-10 in the peritoneal lavage and serum levels of estrogen in treated animals compared to controls. In conclusion, CTZ has antiangiogenic, anti-inflammatory and suppressive effects of estrogen production in an experimental model of endometriosis, without presenting toxicity, and may be a promising drug in the disease's treatment.

Keywords: Endometriosis, Treatment, Clotrimazole, Estrogen, Angiogenesis, Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Visão macroscópica de lesão endometriótica no peritônio..... | 14 |
| Figura 2 - | Macroscopia de lesão endometriótica no reto sigmoide..... | 15 |
| Figura 3 - | Estrutura química do clotrimazol..... | 27 |
| Figura 4 - | Mecanismo de ação dos azóis..... | 27 |
| Figura 5 – | Estabelecimento do modelo experimental de endometriose peritoneal..... | 33 |
| Figura 6- | Linha do tempo do tratamento do modelo de endometriose peritoneal..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| Ensp | Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| CTZ | Clotrimazol |
| THIN | The Health Improvement |
| HRT | Terapia de reposição hormonal |
| CA-125 | Antígeno Anticâncer 125 |
| CA-119 | Antígeno Anticâncer 119 |
| ASMR | American Society for Reproductive Medicine |
| ESHRE | European Society of Human Reproduction and Embryology |
| AINE | Anti-inflamatório não esteroide |
| GNRHA | Agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina |
| COX | Ciclo-oxigenase |
| COX | Ciclo-oxigenase 2 |
| RR | Risco relativo |
| IC | Intervalo de confiança |
| NETA | Noretindrona |
| FDA | Food and Drug Administration |
| E1 | Estrona |
| E2 | Estradiol |
| CYP51 | Enzima esterol 14 α -desmetilase |
| CYP9 | Enzima aromatase |
| CEUA | Comissão de Ética de Uso Animal |
| UEZO | Centro Universitário Estadual da Zona Oeste |
| PFA | Paraformaldeído |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| VO | Via oral |
| IP | Via intraperitoneal |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VEGFR-2 | Receptor fator de crescimento endotelial vascular 2 |
| ERA | Receptor de estrogênio alfa |
| BSA | Albumina sérica bovina |

| | |
|-------|--|
| DAB | Diaminobenzidina |
| PGE-2 | Prostaglandina 2 |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| DBC | Diagnostics Biochem Canada |
| EDTA | Anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético |
| AST | Aminotransferase de aspartato |
| ALT | Aminotransferase de alanina |
| IL | Interleucina |
| BZA | Bazedoxifeno |
| CE | Estrogênio conjugado |
| TSEC | Estrogênio conjugado específico do tecido |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | TEORIAS ETIOPATOGÊNICAS DA ENDOMETRIOSE..... | 16 |
| 2.2 | EPIDEMIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE | 17 |
| 2.3 | DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRIOSE | 20 |
| 2.4 | TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE | 22 |
| 2.5 | CLOTRIMAZOL | 27 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 31 |
| 4 | OBJETIVOS | 32 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 32 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 32 |
| 5 | METODOLOGIA | 33 |
| 5.1 | MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE..... | 33 |
| 5.2 | TRATAMENTO COM CLOTRIMAZOL | 34 |
| 5.3 | PESO DOS ANIMAIS | 35 |
| 5.4 | ANÁLISE DO EFEITO DO CLOTRIMAZOL NA ENDOMETRIOSE | 35 |
| 5.4.1 | Análise histológica, imunohistoquímica e histomorfométrica | 35 |
| 5.4.2 | Citometria de fluxo | 37 |
| 5.4.3 | Imunoensaio enzimático | 37 |
| 5.5 | ANÁLISE TOXICOLÓGICA DO CLOTRIMAZOL..... | 40 |
| 5.5.1 | Análise hematológica | 40 |
| 5.5.2 | Análise bioquímica | 40 |
| 5.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 41 |
| 6 | RESULTADOS | 42 |
| 6.1 | EFEITOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DO CLOTRIMAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE | 42 |
| 6.2 | EFEITOS DO CLOTRIMAZOL NA VIA DE PRODUÇÃO DO ESTROGÊNIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE..... | 54 |
| 7 | DISCUSSÃO | 75 |
| 8 | CONCLUSÃO | 79 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS..... | 80 |
| ANEXO A..... | 90 |

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma patologia ginecológica inflamatória que se caracteriza pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Essa doença ocorre em 10% das mulheres em idade reprodutiva no mundo (GIUDICE et al., 2010) e os principais sintomas são dor pélvica crônica, dismenorréia, dispareunia e infertilidade/subfertilidade (STRATTON et al., 2011).

Várias teorias podem explicar o surgimento da endometriose, porém a mais aceita atualmente é a menstruação retrógrada, proposta por Sampson (1927). Essa teoria sugere que fragmentos de endométrio sofrem refluxo, retornam pelas tubas uterinas, caem no peritônio, onde se aderem, dando início ao desenvolvimento da doença (SAMPSON, 1927).

Para a visualização das lesões, a primeira opção de exame utilizada é a ultrassonografia, mas outros métodos de imagem como a ressonância magnética, possibilitam ao médico identificar alguns tipos de lesões (KUZNETSOV et al., 2017; THALLURI, 2017). Contudo, o diagnóstico definitivo de endometriose apenas é confirmado a partir de vídeo laparoscopia seguida de biópsia e análise histopatológica (DANIILIDIS; PADOS, 2017). A laparoscopia além de ser o método diagnóstico padrão ouro da doença, é um dos tipos de tratamento cirúrgico, pois permite ao médico localizar e remover as lesões endometrióticas no ato da cirurgia (MOHAMED et al., 2013). Entretanto, é um método invasivo, de alto custo e possui alta taxa de recorrência da doença após cirurgia, estimada em 30% a 50% das pacientes após cinco anos (SORIANO et al., 2017).

O tratamento clínico atual da endometriose tem por base alívio dos sintomas, a supressão da produção de estrogênio e indução da amenorreia, apresentando vários efeitos adversos como ganho de peso, câibras musculares, acne e seborreia (DUNSELMAN, 2014). Até o momento, não existe nenhum fármaco capaz de erradicar por completo os focos da doença de forma definitiva (BEDAIWY, 2017). Nesse aspecto, surge a necessidade de pesquisar por novas opções de tratamento que sejam efetivos na eliminação por completo as lesões de endometriose, com mínimos ou nenhum efeito adverso.

O clotrimazol (CTZ) é um antifúngico sintético, utilizado atualmente na prática clínica para o tratamento de *Candida albicans* e outras infecções fúngicas. Já é descrito que o CTZ inibe a proliferação de células cancerígenas, incluindo células endoteliais, sugere-se então que o CTZ possa ser útil para o tratamento de doenças dependentes do

processo angiogênico (TAKAHASHI et al., 1998; FURTADO et al., 2012) . O CTZ também suprime a produção de estrogênio através da inibição da enzima aromatase (TRÖSKEN et al., 2004). Estudos demonstram a eficácia do efeito antiangiogênico desse fármaco em diferentes tipos de câncer como melanoma, carcinoma epidermóide, câncer de mama e câncer cervical (FURTADO et al., 2012; WANG et al., 2014; CHUNG et al., 2015; LIU et al., 2016). Como a endometriose apresenta características de um processo neoplásico benigno, com potencial de malignidade (WEI; WILLIAM; BULUN, 2011), surgiu a ideia de se testar o CTZ em modelo pré-clínico de endometriose.

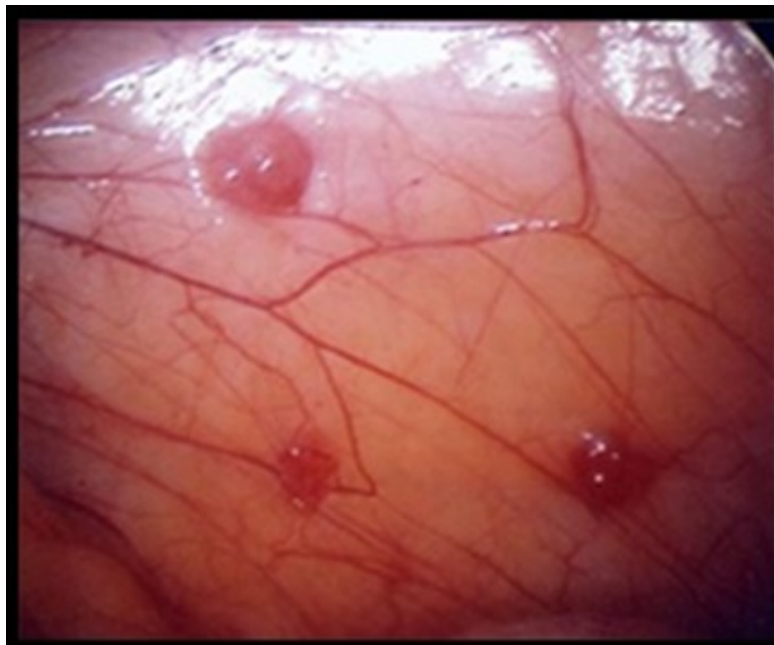
Sabendo então que o CTZ possui características antiangiogênicas e é um potente inibidor da aromatase, principal enzima da via de produção do estrogênio, que o tratamento clínico atual da endometriose não é capaz de erradicar por completo a doença e o tratamento cirúrgico é um método invasivo, de alto custo e que possui alta taxa de recorrência da doença, a busca por novas terapias torna-se necessária. Nesse contexto, o presente estudo avaliará o efeito farmacológico e toxicológico do CTZ em modelo experimental de endometriose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica que se caracteriza pela presença de tecido endometrial ectópico fora da cavidade uterina, acometendo principalmente peritônio pélvico, ovários, cólon sigmóide, ligamentos uterossacos, face posterior do útero, fundo-de-saco e bexiga e pode ainda comprometer colo do útero, íleo, apêndice, vulva, diafragma, septo retovaginal, vagina, rins, parede abdominal e regiões inguinais (KENNEDY et al., 2005).

Macroscopicamente, a doença pode apresentar implantes como bolhas, implantes planos ou manchas na superfície pélvica. Entretanto, esses implantes podem ocorrer também na superfície peritoneal ou em órgãos pélvicos, ou invadem o peritônio e crescem formando nódulos (**Figura 1**) (ASRM, 1997). A coloração dos focos de endometriose varia entre marrom, vermelho, branco e transparente e estão associadas à idade da lesão, padrão e conteúdo glandular, sendo difícil padronizar a descrição das lesões (DONNEZ et al., 2003; STREHL et al., 2014).

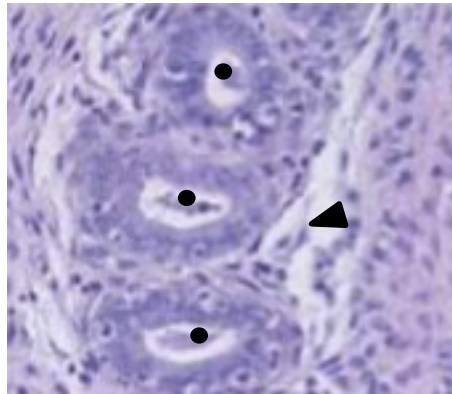
Figura 1 Visão macroscópica de lesão endometriótica no peritônio.



Fonte: ABRÃO, 2000.

Microscopicamente, como já dito anteriormente, as lesões de endometriose se caracterizam pela presença de tecido endometrial funcional, fora da cavidade uterina (**Figura 2**), dando origem a um processo inflamatório crônico que pode conter hemorragia e fibrose de padrão cicatricial associados a estroma e/ou glândulas (ABRÃO, 2000; GIUDICE; KAO, 2004).

Figura 2 Histologia de lesão endometriótica peritoneal.



Observam-se elementos glandulares (●) e estromais (▲). Aumento: 200X.
Fonte: MACHADO, 2010.

2.1 TEORIAS ETIOPATOGÊNICAS DA ENDOMETRIOSE

Várias teorias propõem explicações para a patogênese da endometriose, dentre elas destacam-se a metaplasia celômica, disfunção imune e menstruação retrógrada (SOURIAL; TEMPEST; HAPANGAMA, 2014). A teoria da metaplasia celômica sugere que a endometriose se desenvolve a partir de células extra-uterinas que, de forma anormal, se diferenciam em células endometriais. Essa diferenciação ocorre por fatores hormonais ou imunológicos que estimulam a transformação do tecido/célula peritoneal em tecido semelhante ao endométrio (BURNEY; GIUDICE, 2012; FIGUEIRA et al., 2011; GRUENWALD, 1942). Essa teoria suporta que a endometriose pode ser encontrada em qualquer lugar onde o mesotélio esteja presente, como por exemplo, na cavidade pleural, diafragma, cérebro e vários outros órgãos.

A teoria da disfunção imune descreve que doenças autoimunes, por serem mais comuns em mulheres com endometriose, apoia a possibilidade de que a patogênese da doença pode envolver uma resposta imune alterada nessas pacientes (SINAI et al., 2002). Além disso, as mulheres com endometriose têm uma quantidade maior de macrófagos ativos, porém essa resposta inflamatória é defeituosa e impede a eliminação dos detritos menstruais, promovendo a implantação e crescimento de células endometriais nos locais ectópicos (SIKORA; MIELCZAREK-PALACZ; KONDERA-ANASZ, 2011). As células imunes e endometriais secretam citocinas e fatores de crescimento, o que induz a proliferação celular e angiogênese, promovendo assim a implantação e crescimento das lesões de endometriose (CHRISTODOULAKOS et al., 2007; KYAMA et al., 2009; LASCHKE; GIEBELS; MENGER, 2011; MCLAREN et al., 1996).

A teoria da menstruação retrógrada é a mais aceita até hoje para o surgimento da endometriose. Descrita por Sampson (1927), essa teoria sugere que fragmentos de tecido endometrial retornam através das tubas uterinas e caem na cavidade peritoneal. Entretanto, esse refluxo menstrual ocorre entre 76% e 90% das mulheres que possuem as tubas desobstruídas, porém nem todas são portadoras de endometriose (SASSON; TAYLOR, 2008). Essa teoria é consolidada por transplantes de fragmentos de endométrio que, quando realizados *in vitro* crescem com morfologia endometrial. Um ponto importante nessa teoria é o fato de que o aumento da descamação e do volume de líquido retrógrado encontrados na pélvis de pacientes com endometriose é maior em comparação à pacientes saudáveis. Para que ocorra o desenvolvimento da doença, o fragmento endometrial extravasado deve aderir na superfície peritoneal, invadir a membrana basal e a matriz extracelular e adquirir novos vasos sanguíneos para o estabelecimento e sobrevivência da lesão (GIUDICE, 2010; KONINCKX; KENNEDY; BARLOW, 1998).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

A doença possui uma prevalência estimada de 1-10% e uma incidência de 0,1-0,3% dentre mulheres férteis (MORASSUTTO et al., 2016; SAAVALAINEN et al., 2018). Alguns estudos sugerem como estimativa de prevalência que a endometriose afeta até 10% das mulheres da população geral em pré-menopausa, e aproximadamente 30-50% das mulheres que possuem a doença, são sintomáticas. Entretanto, a verdadeira prevalência e incidência de endometriose na população feminina geral ainda não é suficientemente clara, visto que é uma doença de difícil diagnóstico e algumas vezes assintomática (ESKENAZI; WARNER, 1997; CRAMER; MISSMER, 2002; ROGERS et al., 2009; EISENBERG et al., 2018).

Um estudo retrospectivo de base populacional realizado no Reino Unido utilizou as bases de dados informatizadas do *The Health Improvement Network* (THIN), um provedor do serviço de saúde, que possui registros de 2 milhões de membros que representa um quarto da população israelense para avaliar a taxa de prevalência pontual bruta (31 de dezembro de 2015) e a taxa de incidência anual (2000-2015) de endometriose em mulheres de 15 a 55 anos. As pacientes prevalentes foram caracterizadas e estratificadas de acordo com as características sociodemográficas e clínicas, incluindo infertilidade e doenças crônicas. A prevalência pontual de

endometriose foi de 10,8 por 1000 (IC 95% 10,5-11,0). Mulheres entre 40 e 44 anos tiveram a maior taxa de prevalência de 18,6 por 1000 (IC 95% 17,7-19,5). A infertilidade foi observada em 37% das mulheres com a doença. Além disso o estudo registrou uma taxa de incidência anual média de 7,2 por 10.000 (IC 95% 6,5-8,0) (EISENBERG et al., 2018).

A endometriose é a terceira principal causa de hospitalização ginecológica nos Estados Unidos, e esse número pode ser decorrente do atraso no diagnóstico definitivo da doença, que pode variar de seis anos ou mais, considerando o início dos sintomas (VELEBIL et al., 1995; SELCUK; BOZDAG, 2013). Mc Leod e Retzlöff (2010) realizaram um estudo de revisão no qual investigaram parâmetros epidemiológicos existentes, principalmente os fatores de risco associados à endometriose, e observaram que os três grupos mais frequentes em relação à prevalência da doença são: pacientes assintomáticos submetidos a um procedimento não relacionado a doença, pacientes sintomáticos submetidos a laparoscopia ou tratados empiricamente e pacientes inférteis, sendo este último o de prevalência mais alta, com variação de 5% a 50% (MCLEOD; RETZLOFF, 2010). Barbosa *et al.*, (2014) realizaram um estudo transversal comparativo com 387 mulheres brasileiras inférteis com e sem endometriose, e observaram que 94% das mulheres com endometriose sofrem de infertilidade primária e a prevalência de mulheres com endometriose e infertilidade secundária foi de aproximadamente 6% (BARBOSA et al., 2014).

Por ser uma doença estrogênio-dependente, a endometriose pode ocorrer após a menarca ou no início da idade adulta. Na maioria dos casos, o hipoestrogenismo induzido devido à cessação da ovulação na menopausa, leva à regressão das lesões endometrióticas e conseqüente alívio dos sintomas. Porém, mesmo após a menopausa, algumas lesões podem permanecer, causando persistência de dor incapacitante e outros sintomas da doença. Isso pode ser explicado porque as lesões podem ser estimuladas por fontes de estrogênio extra-ovarianas, como tecido adiposo, glândulas adrenais ou uma fonte exógena (como a terapia de substituição hormonal, HRT) (BENDON; BECKER, 2012; BULUN et al., 2002; STREULI et al., 2017).

Um estudo de revisão realizado por Mcleod e Retzlöff (2010) mostra que o desenvolvimento da endometriose pode ter uma base genética, assim como o consumo de álcool, cafeína e alimentos com alto teor de gorduras em geral também podem aumentar o risco da doença. A revisão cita alguns estudos que sugerem que distúrbios imunológicos podem aumentar o risco de desenvolver endometriose, como o

Endometriosis Family Study, onde 4.000 pacientes responderam a questionários, a prevalência de artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, hipotireoidismo, hipertireoidismo e esclerose múltipla foi maior em pacientes com endometriose quando comparado a população em geral (SIMPSON et al., 1980; BRITTON et al., 2000; MCLEOD; RETZLOFF, 2010). Esses dados mostram que a endometriose é uma doença em que múltiplos fatores de risco podem estar associados ao seu desenvolvimento, como histórico familiar, estilo de vida e comorbidades (MCLEOD; RETZLOFF, 2010).

Apesar de 10,7% das pacientes com endometriose serem assintomáticas (SINAI et al., 2008), a maioria apresenta sintomas como dismenorrea (51,7%), dispareunia (57,5%) e dor pélvica (51,7%) (CARDOSO et al., 2016). Além disso, os sintomas por serem dolorosos, podem prejudicar significativamente o bem-estar físico, mental e social da paciente. A infertilidade pode causar estresse psicológico, baixa autoestima e depressão, e todos esses fatores, isolados ou combinados, supostamente reduzem a qualidade de vida dessas pacientes (NNOAHAM et al., 2011). Esses achados comprovam que as manifestações clínicas são de intensidade variável, e que a intensidade dos sintomas não se relaciona com a gravidade da doença (BELLELIS et al., 2010; BULLETTI et al., 2010).

Fauconnier *et al.*, (2013) realizaram entrevistas com 41 pacientes de quatro centros de referência, utilizando critérios qualitativos para avaliar a presença de sintomas dolorosos. Após análise pelo método de Colaizzi, 33 pacientes apresentaram endometriose infiltrativa em diferentes locais, incluindo endometriose intestinal (n=12) ou de bexiga (n=5), 14 apresentaram endometriose ovariana (três sem endometriose infiltrativa associada) e 5 apresentavam apenas endometriose superficial. Durante o estudo, as pacientes descreveram a dor pélvica como "grave", "incapacitante", "debilitante", interferindo com vida cotidiana. Os relatos de cada paciente foram muito distintos, sugerindo que a descrição e interpretação da experiência de dor relatada por cada uma poderia explicar a variabilidade na conclusão do diagnóstico da doença. Sintomas intestinais como náuseas e vômitos, diarreia, constipação ou ambos não foram relatados especificamente por pacientes apenas com endometriose intestinal. Assim como sintomas na bexiga foram encontrados não só em mulheres com endometriose na bexiga, mas também em outros locais. Além disso, neste estudo as pacientes relataram também um comprometimento físico e psicológico da atividade diária devido aos dolorosos sintomas da doença, como permanecer na cama, dificuldades nas atividades diárias, comprometimento da vida sexual e sua relação com seu parceiro

(FAUCONNIER et al., 2013).

Uma revisão integrativa realizada por Marinho *et al.*, (2017) cita um estudo realizado por Marki et al. (2017), em que se utilizou um questionário de qualidade de vida, baseado em 36 itens (*Short Form Health Survey SF-36*) para análise de 193 mulheres com endometriose. O grupo mostrou uma piora na qualidade de vida quando correlacionada com variáveis psicológicas, dificuldades no controle de emoções e sintomas de dor. No modelo construído, essas três variáveis explicaram 55% da variância na qualidade de vida global, 41% da variância na qualidade de vida física e 55% da variância na qualidade de vida mental. A dor foi significativamente associada ao componente mental da qualidade de vida relacionada à saúde, porém indiretamente, através do estresse da paciente (MARINHO et al., 2017; MÁRKI et al., 2017).

Os custos anuais de cuidados em saúde de uma mulher com endometriose sintomática, tratada em centros de referência em países europeus, atingem €3113, semelhante aos custos estimados de saúde em 2009, para diabetes mellitus (€2858), doença de Crohn (€3100-€7447) e artrite reumatoide (€4284) (KÖSTER et al., 2006; LEARDINI et al., 2002; PENG YU et al., 2008).

2.3 DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma doença de difícil diagnóstico, em que o atraso médio do mesmo pode durar de 4 a 10 anos, resultando em menor qualidade de vida da paciente (BALLARD; LOWTON; WRIGHT, 2006; HUDELIST et al., 2012; KUZNETSOV et al., 2017). Para o rastreamento da doença, a primeira opção usada é a ultrassonografia, mas existem outros métodos como a ressonância magnética e a dosagem sérica do biomarcador antígeno de câncer (CA-125), que não é específico para endometriose, mas pode ser utilizado como exame complementar no diagnóstico definitivo da doença (KUZNETSOV et al., 2017). No diagnóstico clínico, ao associar a dor pélvica da paciente à endometriose, o médico deve ter em mente que diversos fatores podem estar contribuindo para a dor e que os níveis da dor devem ser relatados e documentados de acordo com uma escala analógica (0-10) (FALCONE; FLYCKT, 2018). Embora haja pouca correlação entre nível de dor e a gravidade da doença, a endometriose infiltrativa está associada ao aumento do nível de dor (CHAPRON et al., 2012).

Várias modalidades de ultrassonografia são utilizadas para avaliação de doenças que variam de acordo com o tipo e especialidade. A ultrassonografia transvaginal é a primeira opção de imagem para o diagnóstico da endometriose, e caso não seja viável,

como em pacientes que nunca se relacionaram sexualmente, se opta pela ultrassonografia transabdominal da pélvis (HOYOS; JOHNSON; PUSCHECK, 2017). A utilização da ultrassonografia transvaginal possui várias vantagens como sua ampla disponibilidade, aceitação pela paciente, avaliação completa da pelve, procedimento rápido, econômico e informativo (EISENBERG et al., 2017; MABROUK et al., 2017). Além disso, o método possui sensibilidade de 91% (IC 95% 88.1-93.5) e especificidade de 98% (IC 95% 96.7-99.0). Porém, dentre as desvantagens estão o campo de visão restrito, podendo não detectar pequenos nódulos e cistos, além disso, muitas vezes não permite visualizar lesões do trato intestinal (KUZNETSOV et al., 2017).

A ressonância magnética também pode ser usada na avaliação da endometriose. Esse exame desempenha um papel fundamental na orientação da cirurgia e é utilizado para avaliar a extensão da doença (KUZNETSOV et al., 2017). É cada vez mais utilizado, particularmente quando o exame ultrassonográfico não é claro, quando há suspeita de endometriose pélvica profunda ou quando a cirurgia é planejada, pois proporciona melhor resolução de contraste e um campo de visão maior comparado ao ultrassom (BOURGIOTI et al., 2017). A ressonância possui sensibilidade e especificidade variando de 69 a 92% e 75 a 98%, respectivamente (GOUGOUTAS et al., 2000; STRATTON et al., 2003). Como desvantagens, a ressonância magnética possui limitações quando se trata de pacientes com obesidade mórbida, claustrofobia e outras contra-indicações médicas, além de problemas estruturais que podem interferir na visualização dos ovários. Essa técnica também é dispendiosa, demorada e limitada aos departamentos de radiologia (HOYOS; JOHNSON; PUSCHECK, 2017; THALLURI; KNOX; NGUYEN, 2017).

A dosagem do CA-125 sérico é utilizada para detecção do câncer de ovário de origem epitelial e pode ser utilizado como exame complementar para diagnóstico de endometriose, assim como outros marcadores como CA19-9, interleucinas 6, 8 e 10 e o fator de necrose tumoral alfa (MIHALYI et al., 2010; FASSBENDER et al., 2015). Estudos mostram que há forte associação entre os altos níveis séricos de CA-125 e o estágio avançado de endometriose, tornando a dosagem desse biomarcador útil na diminuição do intervalo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico definitivo (CHENG; WANG; CHOU, 2002; KARIMI-ZARCHI et al., 2016). Este exame possui especificidade de 96% (IC 95% 81,7-99,9%) e a sensibilidade foi de 57% (IC 95% 37,4-74,5%) (HIRSCH et al., 2017). A limitação da dosagem sérica de CA-125 é que esse biomarcador não é específico para a endometriose e a sua dosagem normal não descarta

a presença da doença (NISENBLAT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Estudos mostram que a endometriose é principalmente diagnosticada por laparoscopia seguida de exame histopatológico (ALMEIDA FILHO; OLIVEIRA; AMARAL, 2008; KENNEDY et al., 2005). Esse procedimento permite o médico identificar os focos da doença e fazer a retirada para a confirmação histopatológica, conforme os critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) e da *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) (DANIILIDIS; PADOS, 2018). O exame laparoscópico apresenta 97,68% de sensibilidade e 79,23% de especificidade (ALMEIDA FILHO; OLIVEIRA; AMARAL, 2008). A combinação desses dois tipos de exame aumenta a sensibilidade do diagnóstico definitivo da doença, diminuindo assim possíveis erros (WALTER et al., 2001; ALMEIDA FILHO; OLIVEIRA; AMARAL, 2008).

2.4 TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE

Atualmente, o tratamento da endometriose pode ser clínico ou cirúrgico, sendo o tratamento clínico baseado no alívio dos sintomas, já que não existe um medicamento capaz de erradicar por completo os focos da doença, e o cirúrgico que também é a principal forma de diagnóstico (ABRÃO, 2000; BARRA et al., 2018).

O tratamento cirúrgico da endometriose é principalmente indicado para pacientes com dor que não é aliviada após o tratamento clínico, infertilidade irreversível, endometriomas e endometriose infiltrativa profunda sintomática (OLIVE; SCHWARTZ, 1993; OZYUREK; YOLDEMIR; KALKAN, 2018). Um dos métodos cirúrgicos utilizados em certos casos graves da doença é a histerectomia (remoção completa ou parcial do útero) em combinação com a remoção de um ou ambos os ovários (ooforectomia) e das tubas uterinas (salpingectomia) (DUNSELMAN et al., 2014; SOLIMAN et al., 2016). A laparotomia vem sendo rapidamente substituída pela laparoscopia (cirurgia minimamente invasiva) no campo de cirurgias ginecológicas (BRADFORD; BORUTA, 2013). Pois ao contrário da laparotomia, a laparoscopia possui diversos benefícios, como redução da dor pós-operatória, rápida recuperação, menor custo, redução da morbidade/mortalidade e melhoria geral nos resultados (JUNG; KIM; KIM, 2009; SALAMAH; ABUZOID; ABU-ZAID, 2017). Esse tipo de cirurgia é o mais realizado para a remoção das lesões profundas da doença e conseqüente alívio da dor (SURREY, 2010; SOLIMAN et al., 2016).

Apesar de o tratamento cirúrgico ser efetivo na remoção das lesões

endometrióticas, já foi descrito uma taxa de recorrência de endometriose em 30% a 50% das pacientes após cinco anos da realização da cirurgia (CEA SORIANO et al., 2017). Em um estudo realizado entre 2008 e 2013, com 352 pacientes que foram submetidos à cirurgia, foi observado que 191 pacientes apresentaram recorrência de endometriose ovariana (endometrioma) (TOBIUME et al., 2016). Sabe-se também, que após o tratamento cirúrgico, a taxa de recorrência de endometriose tende a ser maior em mulheres com estágios avançados da doença (PARAZZINI et al., 2005). Além disso, por ser um método invasivo, a cirurgia pode causar danos a órgãos adjacentes aos afetados pela endometriose, bem como ocorrer complicações pós-operatórias, como a formação de adesão ou infecção (METTLER; RUPRAI; ALKATOUT, 2014).

Outro ponto relevante é que o tratamento cirúrgico é um método caro. Soliman *et al.*, (2016) realizaram uma revisão sistemática e mostraram que os custos relacionados ao tratamento cirúrgico da endometriose nos EUA variam entre US \$ 4852 para laparoscopia, e US \$ 12 894 para histerectomia abdominal (SOLIMAN et al., 2016). Além disso, nesta revisão os autores citam um estudo prospectivo, randomizado realizado no Brasil por Ikeda et al. (2005), em que foram avaliadas 54 pacientes com diagnóstico clínico de endometriose pélvica do estágio I e II que foram submetidas à microlaparoscopia sob sedação, microlaparoscopia sob anestesia geral e laparoscopia convencional para diagnóstico definitivo e tratamento da doença. O estudo mostra que os custos da laparoscopia no Brasil variaram de R\$ 203 a R\$ 389 (IKEDA et al., 2005).

O tratamento clínico normalmente é focado na supressão da produção de estrogênio e indução da amenorreia, inibindo o crescimento das lesões e prevenindo a progressão da endometriose, porém o tratamento clínico possui várias limitações tornando a cirurgia fundamental no caso de lesões profundas, por exemplo (BEDAIWY et al., 2017). Dentre as terapias medicamentosas para o tratamento clínico da endometriose utilizadas atualmente encontram-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), contraceptivos orais, progestágenos, agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRHa), andrógenos e inibidores da aromatase (BEDAIWY et al., 2016).

A ação anti-inflamatória dos AINEs está associada com a inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), reduzindo dessa forma a produção de tromboxanos e prostaglandinas, moléculas envolvidas na gênese da dor associada à endometriose (COBELLIS et al., 2004). Os AINEs são largamente utilizados no tratamento dos sintomas da endometriose, porém não há evidência da eficácia de cada fármaco dessa

classe individualmente (RAY et al., 2015). Nosso grupo já descreveu o efeito significativo do parecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, na redução do tamanho das lesões endometrióticas em modelo experimental de endometriose (MACHADO et al., 2010b). Um estudo de revisão com inibidores da COX-2 revelou que outros inibidores específicos da COX-2, como rofecoxib, também têm a propriedade de bloquear o crescimento de células ectópicas e induzir apoptose, com resultado equivalente a estudos com análogos de GnRH (ZARGHI; ARFAEI, 2011). Contudo, os AINEs estão associados a vários efeitos adversos, entre eles o aumento da pressão arterial, diarreia, dor abdominal, dispepsia, infarto do miocárdio, náusea, refluxo gastresofágico, vômito e aumento de peso (ANVISA, 2015; OLADOSU; TU; HELLMAN, 2017).

Os contraceptivos orais agem inibindo a produção de estrogênio gonadal, bloqueando o eixo hipotálamo-ovário e induzindo uma supressão da função ovariana. Além disso, ao suprimir a atividade ovariana, há uma redução na produção de prostaglandinas induzida por estrogênio, diminuindo a inflamação associada à endometriose (ZITO et al., 2014). Apesar da eficácia limitada, os contraceptivos orais são a primeira opção de tratamento para dor associada à endometriose peritoneal, devido a menor quantidade de efeitos colaterais quando comparado às outras classes de medicamentos (DUNSELMAN et al., 2014). Um estudo de coorte não randomizado com acompanhamento de mais de 17.000 mulheres por até 23 anos, mostrou que o risco de endometriose era baixo em mulheres que faziam o uso de contraceptivos orais até o término do estudo (RR 0,4; IC 95% 0,2-0,7), e elevado em mulheres que usavam essa classe de medicamento e cessaram o uso (RR: 1,8; IC 95%: 1,0-3,1 em mulheres que pararam 25-48 meses antes do término) (BEDAIWY et al., 2016). Por outro lado, os contraceptivos orais impedem a implantação embrionária devido à supressão da ovulação, sendo uma limitação para pacientes que desejam engravidar (BEDAIWY et al., 2017).

Os progestágenos representam a próxima linha de tratamento para pacientes com dor associada à endometriose que, por algum motivo, não podem utilizar contraceptivos orais (TAYLOR, 2017). Esta classe de medicamentos possui uma alta seletividade para os receptores de progesterona e quase nenhuma afinidade de ligação ao receptor de estrogênio, possuindo um efeito poderoso sobre o endométrio, causando inicialmente decidualização do tecido endometrial, posteriormente, para tratamentos prolongados, causa atrofia das lesões e inibe o aumento do nível de estradiol, suprimindo assim a ovulação (LAGANÀ et al., 2017). O acetato de noretindrona (NETA) é um

progestágeno derivado da 19-nortesterona, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da dor associada à endometriose. Mostra-se uma opção econômica para as pacientes que possuem um perfil tolerável aos efeitos adversos desta classe (VERCELLINI et al., 2016). Outro exemplo de progestágeno é o dienogest, derivado da 19-nortestosterona que possui as propriedades farmacológicas da combinação de derivados de 19-nortestosterona com os de derivados de progesterona natural. No entanto, o dienogest não deve ser administrado a pacientes com diabetes, doença hepática grave, histórico de tumores hepáticos ou doenças malignas dependentes de hormônios sexuais (SCHINDLER, 2011; SZUBERT; ZIĘTARA; SUZIN, 2018). A utilização de progestágenos para o tratamento dos sintomas de endometriose é limitada devido a quantidade de efeitos adversos, dentre eles o ganho de peso, câibras musculares, acne, seborréia, diminuição da mama e hirsutismo, todos fortemente relacionados a ação androgênica (VERCELLINI et al., 2009).

Os GnRHa agem suprimindo a produção de estrogênio devido a uma baixa regulação dos receptores de GnRH a nível pituitário, causando um hipostrogenismo profundo e, conseqüentemente, amenorréia e uma regressão hipotrófica do endométrio. Essa classe de fármacos é utilizada em caso de falha na terapia com contraceptivos orais ou progestágenos, quando não são tolerados ou são contra-indicados. Os análogos da GnRH fornecem uma redução de sintomas em cerca de 50% dos casos. Entre as limitações encontram-se a alta taxa de recorrência da dor pélvica (5 anos após a interrupção da terapia, a recorrência é de 75%) e os efeitos adversos como depressão, rubor, atrofia urogenital, perda da libido e diminuição da massa óssea (SURREY, 2010; HUANG et al., 2013; WENG et al., 2014; BECKER et al., 2017).

Na classe dos andrógenos encontra-se o danazol, que é um derivado de 17-etinil testosterona e suprime efetivamente os sintomas de dor relacionados à endometriose em 2 meses de uso. Possui vários níveis de ação, dentre eles a inibição central da secreção de gonadotrofina pituitária, inibição direta do crescimento do implante endometriótico e inibição direta de enzimas ovarianas responsáveis pela produção de estrogênio. O uso deste medicamento também é limitado devido a quantidade de efeitos adversos que incluem acne, pele oleosa, hirsutismo, engrossamento da voz, edema, ganho de peso, rubor, vaginite atrófica, labilidade emocional, ganho de peso, retenção de líquidos, enxaquecas, perfil lipídico alterado, tonturas, fadiga e depressão (BEDAIWY et al., 2017; GODIN; MARCOUX, 2015; SZUBERT; ZIĘTARA; SUZIN, 2018).

As pacientes com endometriose possuem uma alta expressão da aromatase,

enzima responsável pela síntese de estrogênio no endométrio ectópico (AMSTERDAM et al., 2005). Após entrar na mitocôndria através da proteína de membrana proteína reguladora esteredoigênica aguda (StAR), o colesterol é convertido em estrona e estradiol por enzimas mitocondriais pertencentes a esta via (HUHTINEN K. et al, 2012). A aromatase é responsável pela conversão de testosterona e androstenediona em estrona (E1) e estradiol (E2), respectivamente, aumentando a produção de estrogênio e a progressão da doença (MORI T. et al, 2018). Existem três gerações de inibidores da aromatase, sendo que a terceira inclui os fármacos letrozol, anastrozol e exemestano (POLYZOS et al., 2011). Um estudo de revisão sistemática teve como objetivo mostrar a eficácia dos inibidores da aromatase não esteroides do tipo II (anastrozol e letrozol) no tratamento da dor causada pela endometriose. Os autores mostraram que o letrozol combinado com acetato de noretisterona é mais eficaz na redução da dor e dispareunia profunda do que acetato de noretisterona sozinho. Entretanto, o letrozol, assim como os outros fármacos dessa classe, possui muitos efeitos adversos como dor de cabeça, rigidez ou dores nas articulações, náuseas e diarreia e o uso prolongado desses medicamentos favorece o início de fraturas ósseas, osteopenia e osteoporose (PAVONE; BULUN, 2012). Assim, observa-se a insatisfação das pacientes no tratamento, causando recorrência dos sintomas após a descontinuação do tratamento (FERRERO S. et al, 2011).

Tendo em vista que o tratamento cirúrgico é um método invasivo e de alto custo, e o tratamento clínico não elimina por completo as lesões, apresenta inúmeros efeitos adversos, impactando diretamente na vida da paciente com endometriose, a busca por novas terapias torna-se necessária.

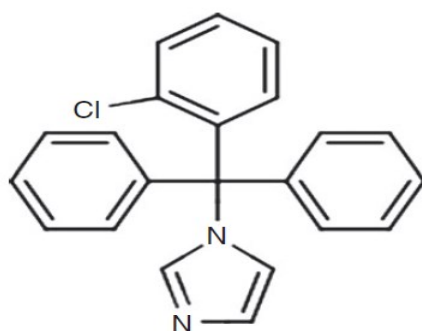
2.5 CLOTRIMAZOL

O CTZ é um fármaco antimicótico sintético que possui amplo espectro, sendo normalmente utilizado na prática clínica para o tratamento de *Candida albicans* e outras infecções por fungos. Suas propriedades antimicóticas foram descobertas no final da década de 1960 por Karl Hienz Buchel (Bayer), como o primeiro composto em uma família de derivados de azóis, sendo patenteado pela Bayer, em 1972 e introduzido nos mercados alemães em 1973, sob a marca Canesten. Além de antimicótico, o CTZ também é utilizado no tratamento de tricomoníase resistente a metronidazol e exibe atividade contra algumas bactérias gram positivas (CROWLEY; GALLAGHER, 2014;

CUDMORE et al., 2004; WANG et al., 2014).

O CTZ é quimicamente peculiar, possuindo quatro anéis aromáticos ligados a um átomo de carbono tetraédrico (sp^3 hibridizado), deixando esse átomo altamente estático (**Figura 3**). Um dos grupos aromáticos do CTZ é um anel de imidazol, e essa estrutura pode mediar reações de transferência de elétrons em sistemas biológicos. Os outros anéis aromáticos compreendem um sistema trifenilmetil, estrutura que forma e estabiliza radicais intermediários, sendo que um desses anéis é substituído por cloro na sua posição C2. Embora o CTZ seja uma molécula aquiral, seus dois anéis de fenil são enantiotópicos, sendo um pro-R e o outro pro-S. Essas especificidades enantiotópicas podem ser diferenciadas de acordo com interações com moléculas quirais (HALLER, 1985; MAST et al., 2013). Por ser uma base fraca, o CTZ interage eficientemente com espécies ácidas presentes em moléculas metabólicas biológicas através do seu nitrogênio não substituído. Este composto é um pó cristalino de fórmula molecular $C_{22}H_{17}ClN_2$ e possui um peso molecular médio de 344,8 g/mol. É uma molécula com características lipofílicas e sua solubilidade em água é de 0,49 mg/L (GOODMAN, 2003).

Figura 3 Estrutura molecular do Clotrimazol.

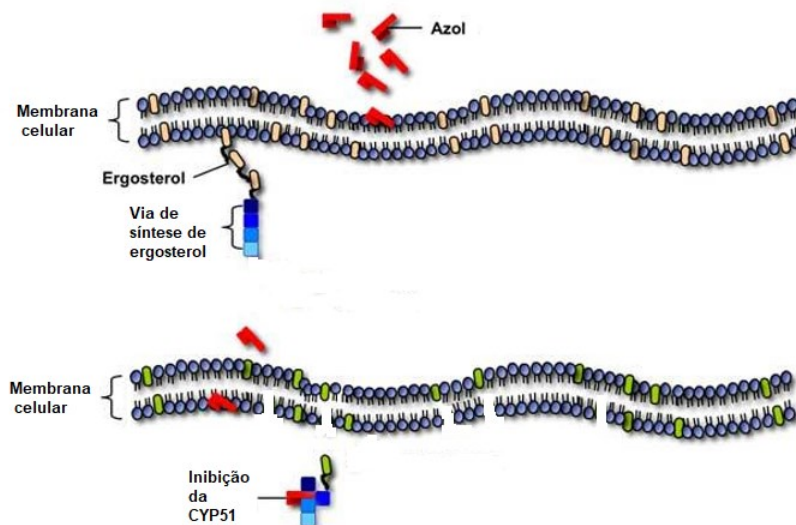


Fonte: CROWLEY; GALLAGHER, 2014

Os antimicóticos azóis agem bloqueando a enzima esterol 14α -desmetilase (CYP51), responsável pela biossíntese de ergosterol, um componente lipídico da membrana plasmática de células fúngicas (**Figura 4**) (VANDEN BOSSCHE et al., 1989). A inibição dessa enzima forma uma ligação coordenada axial com o grupamento heme prostético, afetando assim o potencial de ferro, que é reduzido. Em seguida, compete com o substrato esterol dentro do sítio ativo da enzima. A força da inibição da CYP51 depende da composição estrutural molécula do composto azol, o CTZ inibe 78% da atividade enzimática da CYP51. Estudos mostram que os antifúngicos azóis são fortes inibidores da CYP51 em protozoário, mas que nenhum deles inibe a enzima em

humanos (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Figura 4 Mecanismo de ação dos azóis.



Os antifúngicos azóis agem na inibição da enzima CYP51, responsável pela produção de ergosterol, principal componente da membrana plasmática da célula fúngica. Dessa forma, causa instabilidade na membrana e inviabilidade celular. Adaptado: MOREIRA, 2010.

Os antifúngicos derivados de imidazol e triazol podem ser utilizados tanto tópicamente quanto sistemicamente, sendo a forma de administração desses agentes baseada no custo e na disponibilidade. O CTZ encontra-se disponível em forma de creme, solução, pastilhas e comprimidos vaginais. As aplicações cutâneas são feitas 2 vezes ao dia, a aplicação e o tempo de tratamento da formulação vaginal depende do grau da infecção, sendo as concentrações mais altas utilizadas menos vezes em um menor tempo de tratamento e as pastilhas orais são utilizadas 5 vezes ao dia, durante 14 dias (GOODMAN, 2003).

A absorção do CTZ é mínima quando aplicado topicamente sobre a pele intacta ou inflamada (menor que 0,5%), atingindo o pico da concentração plasmática de 0,001 µg/ml. Para formulações vaginais, a absorção é de 3-10%, sendo essa pequena quantidade absorvida metabolizada pelo fígado e excretada na bile, atingindo o pico da concentração plasmática inferior a 10 ng/ml, após aplicação vaginal de uma dose de 500 mg. A dose oral de 200mg/dia em adultos atinge concentrações plasmáticas de 0,2-0,35µg/ml, seguidas de declínio progressivo. As baixas concentrações plasmáticas dessas formulações podem sugerir que o CTZ provavelmente não causa efeitos

sistêmicos mensuráveis ou a efeitos adversos (GOODMAN, 2003; ANVISA,2015). Além disso, as interações medicamentosas do CTZ não são um problema importante de sua utilização. Pode ser utilizado com segurança paralelamente ao consumo de álcool, pois não afeta a coordenação motora do indivíduo. Também não há evidências de que represente um risco para o desenvolvimento do feto na gravidez e na amamentação, bem como é seguro para uso em idosos (CROWLEY; GALLAGHER, 2014).

Devido à alta tolerabilidade, baixo custo e poucos relatos de efeitos adversos, o CTZ tem sido testado em modelos experimentais (testes pré-clínicos) para o tratamento do melanoma, carcinoma epidermóide, câncer de mama e câncer cervical, já demonstram a eficácia do CTZ, com resultados promissores para o tratamento de diferentes tipos de câncer (FURTADO et al., 2012; WANG et al., 2014; CHUNG et al., 2015; LIU et al., 2016).

Dentre os mecanismos de ação do CTZ, destaca-se a ação anti-angiogênica já descrita no estudo de Takahashi et al 1998, que avaliou o efeito antiangiogênico do CTZ em modelo *in vitro* (10 μ M de CTZ) de células endoteliais e *in vivo* (600mg/Kg/dia de CTZ por via oral) em modelo experimental de angiogênese induzida em camundongos (TAKAHASHI et al., 1998). Takei et al (2003) também mostrou os efeitos anti-angiogênicos do CTZ na carcinogênese de bexiga de ratos que receberam 100mg/kg/dia de CTZ, por via oral (TAKEI; ISEDA; YOKOYAMA, 2003).

O CTZ também apresenta atividade anti-inflamatória, como Thapa et al (2008) mostrou em seu estudo o efeito do CTZ sobre a inflamação na patogênese intestinal utilizando ratos (10 a 50 mg/Kg/dia de CTZ por via intraperitoneal) devido a inibição de IL-8 nas células endoteliais e epiteliais vasculares do cólon (THAPA et al., 2008).

É descrito na literatura os efeitos do CTZ como supressor de estrogênio (AYUB; LEVELL, 1990; GYLLENHAMMAR et al., 2008; BEIJER et al., 2018). Trösken et al (2004) realizaram um estudo em que utilizaram um ensaio fluorimétrico com a enzima CYP19 recombinante humana e dibenzilfluoresceína como substrato para comparar a potência inibitória de 22 compostos azólicos. Os antifúngicos mais potentes na inibição da síntese de estrogênio foram o bifonazol, o miconazol e o clotrimazol (TRÖSKEN et al, 2004).

Como a endometriose é uma doença inflamatória, dependente de estrogênio e do processo angiogênico, o CTZ torna-se um fármaco potencial para o tratamento da endometriose, já que apresenta atividade antiangiogênica (TAKEI et al., 2003), inibe a enzima aromatase (BEIJER et al., 2018) e possui atividade anti-inflamatória (THAPA

et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

- A endometriose é uma doença ginecológica inflamatória e estrogênio-dependente com alta taxa de prevalência e incidência;
- O tratamento cirúrgico é oneroso, invasivo e com recidiva;
- O tratamento farmacológico é ineficaz e com efeitos adversos;
- Tornando a doença um problema global de saúde pública;
- O CTZ possui efeitos positivos no câncer;
- A endometriose, apesar de ser uma doença benigna, possui similaridades com o câncer;
- Além disso, é elucidado que o CTZ possui características antiangiogênica, anti-

inflamatória e inibe a produção de estrogênio;

- Nesse contexto então, surgiu a ideia de testar o CTZ na endometriose.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do CTZ em modelo experimental de endometriose peritoneal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar macro e microscopicamente o efeito do CTZ nas lesões endometrióticas experimentais;

- Verificar o efeito do CTZ na via da angiogênese e da inflamação na endometriose experimental;
- Determinar o possível mecanismo de ação do CTZ na via de produção do estrogênio;
- Estimar a toxicidade do CTZ no tratamento da endometriose experimental.

5 METODOLOGIA

5.1. MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE

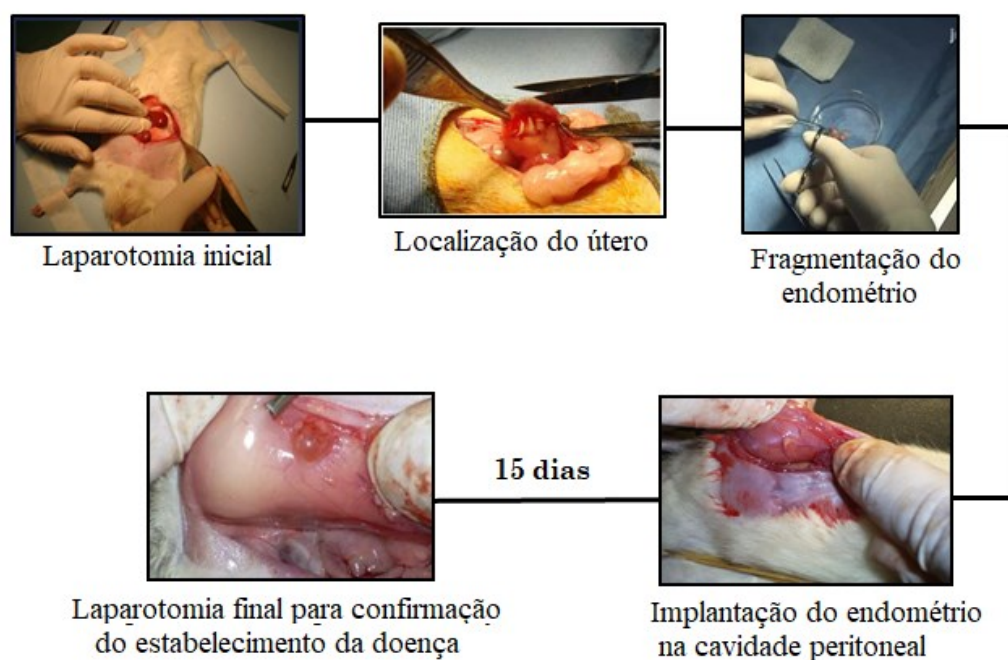
O projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), protocolo CEUA/UEZO 009.2014 (Anexo I). A condução dos experimentos atendeu as diretrizes éticas do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e das Diretrizes de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>. Edição; 2011).

Foram utilizadas ratas da espécie Wistar, com peso corporal entre 250 e 300 g e com oito semanas de idade. Os animais foram mantidos a temperatura de 25°C no Biotério da UEZO, sob um ciclo de iluminação de 12 horas claro/escuro e livre acesso a água e comida.

A indução da endometriose foi realizada conforme o método descrito por Vernon e Wilson em 1985. As ratas foram anestesiadas com injeção intramuscular de 0,2 ml de Ketamina e 0,1ml de Xilazina 2%. Um corte cirúrgico de 3 cm na linha central do abdômen foi realizado para exposição do útero, em seguida, um corno do utero foi removido e colocado em tampão fosfato-salino (PBS), uma solução salina tamponada com fosfato, a temperatura ambiente de 37°C. Consequentemente, esse segmento de aproximadamente 5X5 mm foi dividido longitudinalmente e implantado com fio de nylon (6-0 Prolene, Ethicon, Piscataway, NJ) no peritônio dos animais com a parte endometrial voltada para parede abdominal. Após a cirurgia, os animais tiveram o abdômen fechado e os mesmos alocados em gaiolas de polietileno para devida recuperação (VERNON; WILSON, 1985).

Para confirmação do estabelecimento das lesões endometrióticas, foi necessário um período de 15 dias, conforme descrito anteriormente pelo, nosso grupo, como o tempo ideal e mínimo para implantação das lesões (MACHADO et al., 2010b). Assim, após 15 dias de indução do modelo as ratas foram novamente anestesiadas, outra incisão abdominal foi realizada e as lesões puderam ser identificadas macroscopicamente (**Figura 5**). Nesse momento as lesões foram fotografadas para realizar a medida da área da lesão com o auxílio do programa ImageJ. Em seguida, os animais que desenvolveram as lesões endometrióticas foram alocados aleatoriamente em 4 grupos: controle e tratado com CTZ por via oral (VO) e controle e tratado com CTZ por via intraperitoneal (IP).

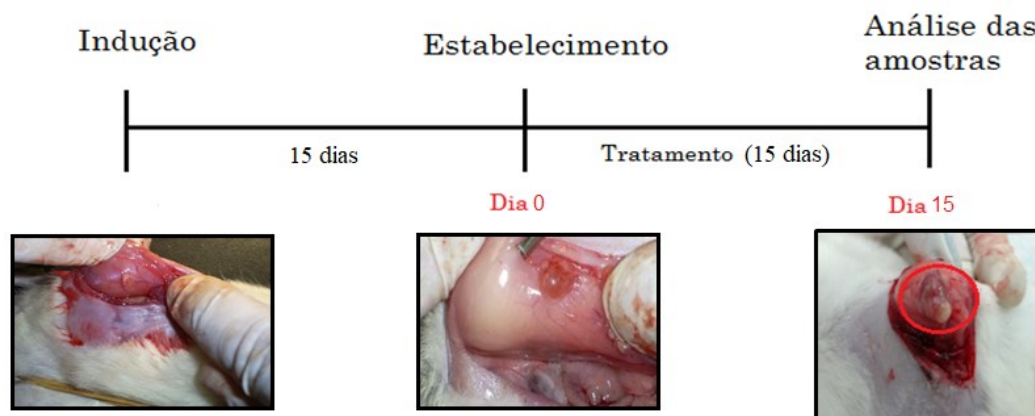
Figura 5 Ilustração do estabelecimento do modelo experimental de endometriose peritoneal.



5.2. TRATAMENTO COM O CLOTRIMAZOL

Os animais dos grupos tratados por via oral ($n= 15$) e IP ($n= 10$) receberam 0,02g/Kg de CTZ por um período de tratamento de 15 dias consecutivos. Aos animais dos grupos controle via oral ($n= 15$) e controle via IP ($n= 10$) foi administrado apenas o óleo de girassol (veículo), pelo mesmo período de 15 dias (**Figura 6**). Antes, durante e ao final do tratamento, os animais foram pesados. Ao final do tratamento (30 dias após a indução da endometriose), os animais foram eutanasiados por *overdose* de anestésicos para coleta das amostras (lesões endometrióticas, fígado, líquido peritoneal e sangue) e análise, conforme metodologias descritas a seguir.

Figura 6 Linha do tempo ilustrando desde a indução até a coleta das amostras do modelo experimental de endometriose.



Indução do modelo de endometriose peritoneal, estabelecimento da doença, início do tratamento com CTZ (Dia 0), final do tratamento (Dia 15) e eutanásia para coleta do material para análise.

5.3 PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados no início do tratamento (D0), sete dias após o início do tratamento (D7) e no final do tratamento (D15). Ao final do tratamento também foram pesados o fígado e a lesão de cada animal. Em seguida, todos os pesos foram organizados em uma planilha Excel e posteriormente realizou-se a análise estatística desses valores.

5.4 ANÁLISE DO EFEITO DO CLOTRIMAZOL NA ENDOMETRIOSE

5.4.1 Análise histológica, imunohistoquímica e histomorfométrica

Após a coleta das amostras, as lesões foram fixadas em paraformaldeído (PFA) e tratadas para análise histológica conforme o seguinte protocolo:

As amostras foram colocadas em cassetes e direcionadas a sucessivos banhos em álcool I, II e III, 30 minutos cada. Foram também banhadas em xilol I, II e III durante 30 minutos e, em seguida, as amostras foram colocadas em parafina I e II por 20 minutos cada. Foram realizados cortes no tamanho de 5µm com um micrótomo. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 30 segundos. Os cortes então foram hidratados sucessivamente em 3 banhos de álcool 70%, 80% e 100%, clarificados com xilol I, II e III, 5 minutos cada. A lamínula foi colada com entellan na lâmina para que as mesmas fossem analisadas no microscópio óptico. A confirmação da viabilidade das lesões era realizada a partir da observação da presença de glândulas e/ou estroma.

Foi realizada imunohistoquímica para identificação de VEGF, seu receptor VEGFR-2, ERα e CYP19 (aromatase) baseada no protocolo a seguir descrito por

MACHADO *et al.*, 2014b. Em resumo, as lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos sucessivos de álcool por 30 minutos cada, depois foram banhadas 3 vezes com xilol por 30 minutos cada e, em seguida, foram banhadas por 5 minutos em água destilada. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato 0,01M, com o pH 6,0 na panela de pressão. Após ferver o tampão, as lâminas foram banhadas nele por 10 minutos. Entre as várias etapas do processo, as lavagens foram feitas com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4), na temperatura de 37°C, em 2 banhos de 5 minutos cada. Posteriormente, foi realizada a inativação da peroxidase endógena com peróxido a 3% por 15 minutos em temperatura ambiente, seguidamente de 2 banhos com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4), em temperatura ambiente, por 5 minutos cada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com tampão fosfato salino/albumina sérica bovina (PBS/BSA) 5% por 30 minutos em câmara úmida. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário monoclonal anti-VEGF (SC 57496 – Santa Cruz Biotechnology) 1:100, anti-VEGFR-2 (SC-6251 - Santa Cruz Biotechnology) 1: 100, anti- ER α (sc-8005 -Santa Cruz Biotechnology) 1:100 e anti- CYP19 (aromatase) (ab-18995 - abcam discover more) 1:100 diluídos em PBS/BSA 1% em câmara escura e úmida overnight. Para controle negativo, utilizou-se apenas o PBS/BSA 1% sem o anticorpo monoclonal. Seguidamente aos 2 banhos com tampão fosfato, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Biotina (K 0690 - DAKO) e Estreptavidina por 30 minutos cada, com 2 banhos com tampão fosfato em temperatura ambiente por 5 minutos cada entre os anticorpos. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) (K 3468 - DAKO) para obter uma coloração castanha, seguido de um banho de água destilada por 2 minutos e depois hematoxilina por 5 minutos e, em seguida, colocados em água corrente por 2 minutos. Por fim, os cortes foram hidratados em 2 banhos de álcool 90% e 100%, clarificados banhos com xilol I, II e III de 5 minutos cada, e montados com lamínula e entellan para posteriormente serem observados em microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japão).

Após análise imunohistoquímica das amostras marcadas com anticorpos anti-VEGF, VEGFR-2, ER α e aromatase, foi realizada a análise histomorfométrica utilizando um microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japão). As amostras marcadas foram fotografadas em câmera digital. Para cada lâmina foram analisados 10 campos aleatórios de maior aumento (40X), utilizando a média dos resultados obtidos. A contagem das áreas marcadas foi analisada em programa de análise de imagem Image Pro Plus 4.0 sendo correlacionada com as áreas demarcadas (per área), expressas em porcentagem.

5.4.2 Citometria de fluxo

Foi realizada a citometria de fluxo para análise da quantidade de macrófagos ativos no local da lesão através do lavado peritoneal. Introduziu-se então 10 ml de PBS no peritônio das ratas e aspirando o líquido em seguida. Após coletado, o material foi colocado em tubos falcon, centrifugado por 5 minutos em uma rotação de 1200 rpm e desprezado o sobrenadante. Ao pellet formado foram adicionados 2 ml de PFA a 4% e, em seguida, colocado na geladeira. Para processamento das amostras foi utilizado o protocolo descrito por (DOS SANTOS et al., 2011):

As amostras foram centrifugadas por 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuscitado em 300 µl de PBS/BSA, em seguida, foi separado em dois tubos falcon, um para o controle negativo e outro para as marcações, deixando por 30 minutos. Posteriormente, o tubo que o anticorpo foi incubado foi centrifugado por 5 minutos, descartado o sobrenadante e colocado 99 µl de PBS e 1 µl do anticorpo F4-80 e MAC-2+ (BM8 FITC - Abcam), deixando incubar por 30 minutos. Após esse período, a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuscitado em 300 µl de PBS/BSA, centrifugado por 5 minutos e descartado o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 500 µl de PBS em cada tubo e estes foram colocados no citômetro (BD Facs Calibur) para leitura. Foram contados 10000 eventos por amostra e os resultados foram analisados usando o programa CellQuest (BD Biosciences, USA).

5.4.3 Imunoensaio enzimático

O lavado peritoneal também foi utilizado para essa análise dos níveis de PGE-2, VEGF, interleucina 10 (IL-10), enquanto o estrogênio foi analisado utilizando-se sangue. Todas as análises foram realizadas pelo método imunoensaio enzimático (ELISA), com base no princípio da competição por anticorpo monoclonal específico. Coletado da mesma forma descrita no item anterior, porém neste caso foi centrifugado por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm até 30 minutos após a coleta. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dividido em eppendorfs de 1,5 ml com 1 ml da amostra em cada tubo, devidamente identificado e acondicionado no freezer de -80°C até o momento da análise.

Para dosagem das concentrações de PGE2 foi utilizado o kit PGE-2 monoclonal EIA da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), segundo o fabricante. Assim, foram

utilizados 50 µl de amostra por poço (no mínimo duas diluições em triplicata), 50 µl de PGE-2 AChE Tracer e 50 µl de PGE-2 anticorpo monoclonal. Em seguida, a placa foi coberta com plástico filme e incubada por 18 horas, à temperatura de 4°C. Após incubação, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, então adicionou-se 200 µl de reagente Ellman e colocou-se a placa em agitador por um período de 60 a 90 minutos. Por fim, realizou-se a leitura na absorvância de 405 nm no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). As concentrações de PGE-2 foram então quantificadas por uma curva de calibração (coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98), com utilização programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA). O limite de quantificação foi de 7,8 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

Para dosar as concentrações de VEGF foi utilizado o kit mouse VEGF ELISA da Boster Immunoleader (Pleasanton, CA), de acordo com recomendações do fabricante. Resumidamente, utilizou-se 0,1 ml de amostra por poço (no mínimo duas diluições em triplicata), 0,1 ml de solução padrão de VEGF por poço e 0,1 ml de tampão diluente da amostra em um poço controle. Cubriu-se a placa com plástico filme e a mesma foi incubada por 90 min à temperatura de 37 °C. Após incubação, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, adicionou-se 0,1 ml de solução biotilada de anticorpo anti-VEGF humano e a placa foi novamente selada e incubada com plástico filme por 60 minutos à temperatura de 37 °C. Em seguida, os poços foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem sendo adicionado 0,1 ml de solução do complexo avidina-biotina-peroxidase por poço e a placa foi novamente selada e incubada por 30 minutos, à 37 °C. Após esse período, foram adicionados 90 µl de agente revelador de cor (TMB) por poço, selou-se novamente a placa e incubou-se por mais 20 minutos a 37 °C. Por fim, realizou-se a leitura na absorvância de 450 nm no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). As concentrações de VEGF foram então quantificadas em uma curva de calibração (coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98), utilizando-se do programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, Califórnia – EUA). O limite de quantificação foi de 15,6 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 1000 pg/ml.

Para a dosagem das concentrações de IL-10, em cada poço foi adicionado um volume de 50 µl de amostra, onde realizou-se pelo menos duas diluições em triplicata, 50 µl de tampão de lavagem e 50 µl do anticorpo IL-10. A placa foi então coberta com plástico filme e incubada à temperatura de 37°C, por 3 horas. Após incubação, os poços

foram esvaziados e lavados com tampão de lavagem, adicionando-se 50 µl de reagente de Anticorpo Biotinilado em cada poço, cobrindo a placa com plástico filme e incubando-a à temperatura de 37°C, por 1 hora. Após incubação, os poços foram novamente esvaziados e lavados com tampão de lavagem, sendo adicionados 100 µl de solução de Streptavidina-HRP em cada poço, cobrindo-se e incubando-se novamente a placa com plástico filme, à temperatura de 37°C, por 30 minutos. O conteúdo da placa foi desprezado e a lavagem foi realizada com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µl de solução de substrato TMB em cada poço, incubando no escuro à temperatura de 37°C, por 30 minutos. Após os 30 minutos, adicionou-se 100 µl de Solução de Paragem em cada poço. Após esse período, a placa foi lida no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) na absorbância de 450 nm, gerando automaticamente as concentrações de IL-10 em uma curva de calibração, com um coeficiente de correlação sempre maior ou igual a 0,98, utilizando-se para isso o programa SoftMax (Molecular Device Corporation, Sunnyvale, CA). O limite inferior de detecção foi de 37 pg/ml e o ponto mais alto da curva foi de 3000 pg/ml.

Os níveis séricos de estrogênio foram quantificados através do kit Elisa fabricado pela Diagnostics Biochem Canada Inc (DBC), em amostras de sangue coletadas da aorta abdominal e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos para a extração do soro para análise do perfil hormonal. Em cada poço foi adicionado um volume de 25 µl de amostra, onde realizou-se pelo menos duas diluições em duplicata. Em seguida foram adicionados 150 µl de Estrogênio- HRP conjugado em cada poço. Agitou-se suavemente a placa por 10 segundos para misturar o conteúdo dos poços. Em seguida, incubou-se com papel filme por 2 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram lavados por 3 vezes com 350 µl de tampão de lavagem diluído. Em seguida, as placas foram batidas firmemente contra papel absorvente para garantir que não houvesse gotículas nos poços. Depois disso, pipetou-se 150 µl de substrato TMB em cada poço com intervalos cronometrados e incubou-se de 20 a 30 minutos, em temperatura ambiente. Após esse tempo, pipetou-se 50 µl de solução de paragem em cada poço, com intervalos cronometrados. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) na absorbância de 450 nm, 20 minutos após a adição da solução de paragem, gerando as concentrações de estrogênio em uma curva de calibração padrão.

5.5 ANÁLISE TOXICOLÓGICA DO CLOTRIMAZOL

5.5.1 Análise hematológica

Na eutanásia dos animais, coletou-se amostras de 5 ml de sangue por punção cardíaca com uma agulha 13 x 4,5 mm e seringa de 5 ml, colocada em um tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A análise hematológica da série branca foi realizada no analisador hematológico Sysmex XS 800i (Registro: 80015490053, Roche, São Paulo, Brasil). Com amostras de sangue periférico de cada animal foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo que foram devidamente identificadas. Com o auxílio de outra lâmina em um ângulo de 45° foi realizado um movimento para frente de modo que a gota fosse carregada por toda a lâmina, formando uma camada delgada e uniforme. Após a fixação em temperatura ambiente foi realizado a coloração com o kit Panótico Rápido (Código: 620529 Laborclin, Pinhais, PR), imergindo cada lâmina por 2 segundos, 3 vezes consecutivas em cada solução (solução 1, 2 e 3). Posteriormente foi realizada a contagem das células brancas em microscópio óptico (Nikon, Tokyo, Japão). Os resultados foram apresentados em porcentagem.

5.5.2 Análise bioquímica

Das amostras de sangue periférico coletadas, 1 ml foi colocado em eppendorf de 1,5ml até a coagulação do sangue (aproximadamente 5 minutos). Posteriormente, o eppendorf foi levado à centrifuga por 5 minutos em uma rotação de 3.000 rpm. Retirou-se então o soro e colocou-se em outro eppendorf de 1,5ml devidamente identificado, deixando na geladeira até a análise.

Para análise da função hepática, utilizou-se kits para dosagens de Aminotransferase de aspartato (AST) e Aminotransferase de alanina (ALT) (Doles, Goiania, GO, Brasil). As dosagens foram aferidas no analisador bioquímico automatizado BioSystems A15. Após eutanásia dos animais, realizou-se também o peso do fígado através de uma balança analítica de precisão e, além disso, o órgão foi analisado macroscopicamente para verificar alteração entre os grupos.

Para análise da função metabólica, foram realizados testes para determinação de glicose e insulina através da utilização de um glicômetro (Accu-chek Active Roche) e um kit ELISA para insulina (Mouse / Rat Insulin kit ELISA, Merck Millipore, MO, EUA). Os resultados obtidos foram anotados em uma planilha Excel para análises estatísticas posteriores.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância para todas as comparações estatísticas foi avaliada. O programa Primer foi utilizado para realização das análises estatísticas e para os gráficos, foi utilizado o programa *Oringin Graph*. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas com teste – t de Student. Para análise morfométrica de VEGF, VEGF-R, ER α e aromatase, cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa de software Stat Xact-5 (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA), considerando $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

Os dados obtidos neste estudo constituíram dois artigos e serão apresentados individualmente em duas partes denominadas: Efeitos farmacológicos e toxicológicos do clotrimazol em modelo experimental de endometriose (artigo 1) e Efeitos do clotrimazol na via de produção do estrogênio em modelo experimental de endometriose (artigo 2).

6.1. EFEITOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DO CLOTRIMAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE

Este artigo teve como objetivo avaliar o efeito farmacológico e toxicológico do CTZ na endometriose peritoneal induzida em modelo experimental. Dessa forma, primeiramente foi avaliado o efeito macro e microscópico do CTZ nas lesões endometrióticas. Em seguida, foram avaliadas as alterações moleculares, angiogênicas e inflamatórias induzidas pelo CTZ na endometriose. Nesse trabalho as ratas Wistar que desenvolveram lesões endometrióticas foram tratadas com CTZ (20mg/kg/dia) ou óleo de girassol por via oral durante 15 dias consecutivos. O tratamento com CTZ diminuiu significativamente o crescimento e o tamanho das lesões, o que foi confirmado pelo exame histológico que indicou regressão e atrofia dessas lesões. Para avaliar o perfil angiogênico, realizamos imunohistoquímica com marcação para VEGF e VEGFR-2, e ELISA para avaliar a concentração de VEGF no lavado peritoneal. O CTZ mostrou características antiangiogênicas, pois a imunohistoquímica revelou uma menor marcação para VEGF e VEGFR-2 na lesão dos animais do grupo tratado (4,09% e 4,77%, respectivamente) quando comparados aos do grupo controle (25,52% e 31,72%, respectivamente), assim como concentração de VEGF no lavado peritoneal dos animais tratados também foi menor (98,07 pg/ml) quando comparado aos animais do grupo controle (151,70 pg/ml). Para avaliação do perfil inflamatório, realizamos ELISA para análise das concentrações de IL-10 e PGE2, além da citometria de fluxo para análise de macrófagos ativos no local da lesão. O CTZ também mostrou características anti-inflamatórias, pois as concentrações de IL-10 e PGE2 no grupo tratado foram menores (100,83 pg/ml e 37,05 pg/ml, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (222,24 pg/ml e 96,29 pg/ml). A quantidade de macrófagos ativos no local da lesão também foi menor no grupo tratado (18,39 %) quando comparado ao controle (38,32%). Finalmente, após avaliarmos o peso corporal e do fígado do animal, o perfil hematológico pelo leucograma, a função hepática (ALT e AST) e metabólica (glicemia e insulina) observamos que o CTZ se mostrou efetivo no tratamento da endometriose sem causar toxicidade. Nesse estudo foi possível observar que o CTZ promove uma melhora geral no quadro da endometriose experimental, provavelmente devido às propriedades anti-angiogênicas e anti-inflamatórias do CTZ, sem causar toxicidade nos animais.

Os resultados deste estudo foram publicados na revista *Molecular and Cellular*

Endocrinology, fator de impacto 3.859, em colaboração com os grupos de pesquisa dos laboratórios da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Laboratório de Oncobiologia Molecular e Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo). As análises adicionais realizadas pelos grupos parceiros foram realizadas com amostras coletadas pelo nosso grupo, após indução do modelo experimental de endometriose e tratamento com CTZ, com o intuito de descrever um possível mecanismo de ação do CTZ na endometriose (Figura 7 do artigo, página 52).



Clotrimazole is effective for the regression of endometriotic implants in a Wistar rat experimental model of endometriosis



Daniel Escorsim Machado^{a,b}, Jamila Alessandra Perini^{a,c}, Erika Menezes de Mendonça^{a,c},
 Jessica Ristow Branco^d, Karina Cristina Rodrigues-Baptista^{a,c}, Jessica Alessandra-Perini^{a,b},
 Jair Machado Espíndola-Netto^c, Thiago Alves dos Santos^a, Wagner Santos Coelho^a,
 Luiz Eurico Nasciutti^b, Mauro Sola-Penna^c, Patricia Zancan^{d,*}

^a Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMo), Departamento de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFar), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Laboratório de Endocrinologia e Controle do Metabolismo (LabMECoM), Departamento de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFar), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Clotrimazole
 Endometriosis treatment
 Angiogenesis
 Inflammatory

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate molecular, angiogenic and inflammatory changes induced by clotrimazole (CTZ) on endometriosis lesions. For this, thirty female Wistar rats with surgically implanted autologous endometrium were treated with CTZ or vehicle (200 mg/kg) via esophageal gavage for 15 consecutive days. CTZ treatment significantly decreased the growth and the size of the implants, and histological examination indicated regression and atrophy, with no toxicity to the animals. The levels of the angiogenic markers VEGF and VEGFR-2 were significantly decreased in CTZ group. The treatment also promotes a reduction on PGE₂ and TNF-α levels. All these effects involve the amelioration of ERK1/2, Akt, AMPK and PERK signaling upon CTZ treatment. In conclusion, CTZ promoted an overall amelioration of endometriosis in a rat model due to the anti-angiogenic properties of the drug. Therefore, our results support the proposal of a clinical trial using CTZ for the treatment of endometriosis.

1. Introduction

Endometriosis, an estrogen-dependent disorder, is characterized by the growth of endometrial tissue outside the uterine cavity, predominantly in the peritoneal pelvis and ovaries (Giudice and Kao, 2004). This condition is a common disorder among women of reproductive age worldwide, with a prevalence of approximately 10% within this group (Bulun, 2009). The prevalence increases up to 50% among infertile women and up to 60% among women and teenagers with pelvic pain (Giudice, 2010). Although considered a benign disease, endometriosis frequently presents characteristics of malignancy, such as cell proliferation and active angiogenesis (Kumar et al., 2011; Machado et al., 2014), and it has been reported as a risk factor for ovarian cancer (Reid et al., 2017; Brinton et al., 2005; Kumar et al.,

2011; Viganò et al., 2007). Many of the symptoms of endometriosis including pelvic pain and infertility are strongly associated with local and systemic inflammation (Giudice, 2010). Indeed, women with diagnosed endometriosis display elevated numbers of immune cells and increased levels of cytokines in lesions and peritoneal fluid compared to healthy women (Beste et al., 2014; Hever et al., 2007; Jeung et al., 2016; Kwak et al., 2002; Schulke et al., 2009; Wu and Ho, 2003). This process leads to the increased production of reactive oxygen species (ROS), which are partially responsible for some symptoms and characteristics of endometriosis, such as cellular stress, aggravated inflammation and pain (Carvalho et al., 2012; Van Langendonck et al., 2002).

Recently, inflammation-triggered oxidative stress has been related to increased angiogenesis in human pathologies, including heart and

Abbreviations: ACC, acetylCoA carboxylase; Akt, protein kinase B; AMPK, AMP activated protein kinase; COX2, cyclooxygenase-2; CTZ, clotrimazole; ERK1/2, extracellular response kinase 1/2; IL-10, interleukin-10; MAPK, mitogen activated protein kinase; PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; PGE₂, prostaglandin E2; ROS, reactive oxygen species; TNF-α, tumor necrosis factor α; UPR, unfolded protein response; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor 2

* Corresponding author.

E-mail address: pzancan@me.com (P. Zancan).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.005>

Received 5 January 2018; Received in revised form 9 April 2018; Accepted 9 April 2018

Available online 22 April 2018

0303-7207/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

vascular diseases, psoriasis and cancer (Armstrong et al., 2011; Kim et al., 2013; Ushio-Fukai, 2006; Xia et al., 2007). Indeed, angiogenesis is crucial for the endometriosis development, since, in order to survive outside the uterus, endometriotic lesions have to create a novel vascular network (Laschke and Menger, 2007; Marf-Alexandre et al., 2015). In this context, not only the increased inflammation and ROS production but also the induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling via VEGFR2 plays the major transducing pathway in the endometriosis angiogenesis process (Cardoso et al., 2017; Machado et al., 2008). Therefore, studies suggest that the targeted inhibition of angiogenesis might offer an important target for the clinical treatment of endometriosis (Laschke and Menger, 2007; Marf-Alexandre et al., 2015).

Clotrimazole (CTZ) is one of the most used antimycotic drugs in gynecology (Zhou et al., 2016). It is a well-tolerated drug, presenting minor side-effects and a broad-spectrum of use (Zhou et al., 2016). Several studies have shown that CTZ also presents anticancer properties (Adinolfi et al., 2015; Furtado et al., 2015, 2012, Marcondes et al., 2015, 2010, Moreno-Sánchez et al., 2009, 2007). These properties involve different mechanisms interfering with cell proliferation, cell survival, cell metabolism, growth signals and presenting anti-inflammatory effects (Chuang et al., 2015; Furtado et al., 2015, 2012, Marcondes et al., 2015, 2010). Therefore, we hypothesized that this drug might be a potential agent for treating endometriosis.

To test this hypothesis, we experimentally induced endometriosis in Wistar rats and treated them with vehicle or CTZ for 2 weeks. The treatment promoted a regression of endometriotic implants in an experimental model of endometriosis. To identify molecular changes in the endometriosis lesions promoted by the treatment with CTZ, we performed a series of Western blot analysis for molecular markers of cell biology, as well as immunohistochemistry, flow cytometry and ELISA immunoassays analyses to investigate whether CTZ modulated angiogenesis and the inflammatory process in the development of endometriosis.

2. Materials and methods

2.1. Endometriosis experimental model and CTZ treatment

Thirty female Wistar rats (200 g and 8 weeks of age) were used in the experimental induction of endometriosis, using the method described earlier (Vernon and Wilson, 1985). All experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines from the Ethics Commission on Animal Use (CEUA), the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>, 8th Edition, 2011) and approved by the State University of West Zone (UEZO) CEUA (protocol code 002/2013). In brief, after the anesthesia with intramuscular injection of ketamine and xylazine, the animal's abdomen was opened and one uterine horn was removed, segmented and split longitudinally. One 5 × 5 mm piece was sectioned and anchored with the endometrium side adjacent to the peritoneum of the ventral abdominal wall by nonadsorbable polypropylene sutures (6 ± 0 Prolene, Ethicon, Piscataway, NJ). Lastly, the abdomen was closed and after fifteen days, ventral midline laparotomy was performed to determine the attachment, viability and the area of endometrial explants.

After one day, the animals were recovered and divided to two groups: CTZ group daily-treated with 200 mg/kg body weight CTZ (Clotrimazole, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) dissolved in sunflower oil; and Control group received sunflower oil only. Both treatments were administered daily by esophageal gavage for 15 consecutive days. Body weight was measured immediately before the first treatment (day zero, D0), on the seventh day of treatment (D7) and on the last day of treatment (D15), when the animals were euthanized by pentobarbital overdose. The peritoneal fluid was collected for flow cytometry and ELISA immunoassay analysis. Then, the abdomen was

opened, and implantation sites were identified by the presence of a lesion or by suture alone. The surface area of each explant was measured (length × width) to the nearest 0,1 mm using calipers and after being excised were weighed and immediately divided for histological and Western blot analysis. In addition, the liver was weighed and blood samples were collected for biochemical and hematological analyses. To evaluate the insulin signaling in the tissues of the animals, 1 h before euthanasia, eight random animals out of fifteen of each group were injected with 0.5 U/kg insulin (Humalin R, Eli Lilly, São Paulo, SP, Brazil) in the tail vein. All assessments were made without taking into account estrous stage.

2.2. Histology, immunohistochemistry and morphometric analysis

Formalin-fixed tissues were paraffin-embedded and cut into 4- μ m-thick sections. Part of the sections were stained with Harris hematoxylin and eosin (HE) and examined microscopically at 200× magnification for the presence of histological hallmarks of endometriosis, such as endometrial glands and stroma. The other paraffin-embedded tissue sections were placed on silane-treated slides and incubated with the following antibodies: monoclonal antibody against VEGF, SC-57496 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:100 dilution and monoclonal antibody against VEGFR-2, SC-6251 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:100 dilution. Incubations were carried out overnight and then revealed using LSAB2 Kit HRP, rat (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA, USA) with diaminobenzidine (3,3'-diaminobenzidine tablets; Sigma, St. Louis, MO, USA) as the chromogen and counterstained with hematoxylin. For each case, negative control slides consisted of sections incubated with antibody vehicle or no immune rabbit or mouse serum. All tissues were examined by two blinded observers using a 400× magnification on light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Coolpix 990; Nikon, Tokyo, Japan). Ten fields of an immunostained section (VEGF and VEGFR-2) were chosen at random and captured from each specimen. Quantification was assessed using captured high quality images (2048 × 1536 pixels buffer) using the Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Histologic scores (H) for VEGF and VEGFR-2 were calculated using the formula $H = \sum P_i$, where I is the intensity ranging from 0 (negative cells) to 3 (deeply staining cells) and P is the percentage of staining cells for each given i, with P values of 1, 2, 3, 4, and 5 indicating < 15%, 15–50%, 50–85%, > 85%, and 100% positive-staining cells, respectively, as previously described (Machado et al., 2016). The staining result was expressed as mean ± standard deviations.

2.3. Western blot analysis

Liquid nitrogen-frozen endometrial explants were grounded, dissolved in the appropriate buffer (Cardim Pires et al., 2017) and submitted to SDS-PAGE according to Laemmli (1970). The gels were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (PVDF Immobilon-P, Millipore), and submitted to Western blot as previously described (Cardim Pires et al., 2017). The antibodies used and their dilutions were as follows: anti-AMPK α (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 2532 RRID: AB_330331), anti-phospho-AMPK α (T172) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 2535 RRID: AB_331250), anti-phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) (S79) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 3661 RRID: AB_330337), anti-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9272 RRID: AB_328927), anti-phospho-Akt (S473) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9271 RRID: AB_329825), anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 4695 RRID: AB_390779), anti-phospho-

ERK1/2 (S202/Y204) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9106 RRID:AB_331768), anti-ACLY (abcam, Cambridge, MA, USA, dilution 1:1000, abcam Cat# ab40793, RRID: AB_722533), anti-phospho-ACLY (S455) (abcam, Cambridge, MA, USA, dilution 1:1000, abcam Cat# ab46796, RRID: AB_867484), anti-eEF2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 2332 RRID:AB_10693546) and anti-actin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, dilution 1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 4967 RRID:AB_330288). Secondary antibodies peroxidase-afininipure goat anti-mouse IgG and peroxidase-afininipure goat anti-rabbit IgG were from Jackson Laboratories (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-035-146 RRID:AB_2307392 and Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-035-144 RRID:AB_2307391), for anti-mouse and anti-rabbit, respectively) and were used at the dilutions of 1:10,000 and 1:20000 respectively. Immunoblotting was performed using PVDF membranes (Merck Millipore, Billerica, MA, USA, PRO2531) and developed using a chemiluminescent peroxidase substrate (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA, RPN2124) followed by scanning using C-DiGit Blot scanner (LiCor, Lincoln, NE, USA).

2.4. ELISA immunoassay

Peritoneal fluid was collected by rinsing the abdominal cavity with 10 mL of PBS and immediately centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Supernatants were stored at -70°C until assayed for VEGF, PGE₂ and IL-10 by use of an enzyme immunoassay kit. The concentrations were calculated in triplicate from standard curves performed by an automatic plate reader (Spectra Max; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif) controlled by SoftMax software (Molecular Devices).

2.5. Flow cytometry

Another washing of peritoneal fluid was obtained from the rat with 10 mL of PBS, pH 7.2. The cells were incubated with monoclonal antibodies PI anti-Mac-2 and FITC anti-F4/80 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). These cells were incubated with Fc blocking (clone 2.4G2) for 10min. After, the samples (10,000 events per sample) were submitted to flow cytometer analysis (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Data analysis were performed in CellQuest (BD Biosciences, USA) and WinMDI 2.9 software packages.

2.6. Biochemical and hematological analysis

Glycemia and insulinemia were evaluated from the blood samples taken using a glucometer (Accu-check Active Roche) and an ELISA kit for insulin (Mouse/Rat Insulin ELISA kit, Merck Millipore, MO, USA), respectively. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were evaluated using the respective kits (Dol, Goiania, GO, Brazil). The leukocyte count was performed using blood smears for differential counts of neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils. The slides were stained (Panotico Fast, Laborclin, Brazil) and viewed under a optic microscope (Nikon, Japan).

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviations (SD) or mean \pm standard error of the mean (S.E.M.), when appropriate and indicated in the legends. Statistical analyses were performed with Student's t-test or two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test, when appropriate and indicated in the legends. For VEGF and VEGFR-2 morphometric analysis, statistical calculations were carried out with use of the Stat-Xact-5 software program (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA). Differences were considered significant when the P values were < 0.05 .

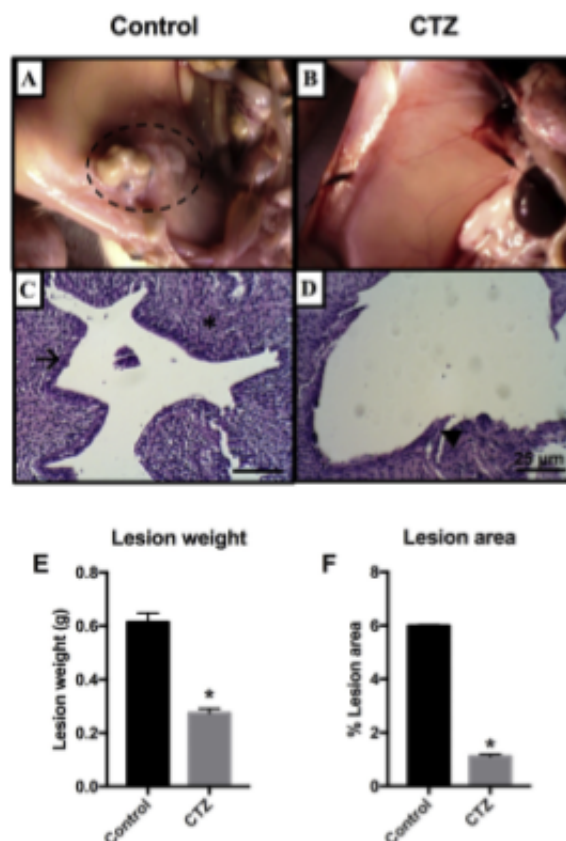


Fig. 1. CTZ suppresses endometriosis growth *in vivo*. In the end of the treatment, endometriotic lesions were evaluated in all the animals by means of direct visualization (panels A and B, as representative images of control and CTZ groups, respectively) and by HE staining and histological analysis (panels C and D, as representative images of control and CTZ groups, respectively). In the control group (A), the observed lesions were cystic and well-vascularized (circle). In the CTZ group (B), was observed a drastic reduction on the implant size and growth of the lesions. The histological analysis showed the presence of the endometrial glands (arrow) and stromal cells (asterisks) in the control group, characterizing the ectopic endometrial tissue. In the treated group (D), an atrophy and regression of the lesions were visualized (arrowheads). Measurements of the lesion weight (E) and area (F) are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 15$). * indicates $P < 0.05$ as compared to control (Student's t-test). The individual values that generated panels E and F are presented in supplementary material (Table S1).

3. Results

3.1. CTZ is effective in reducing endometriosis lesions

After 2 weeks of transplanting endometrial tissue, the explants formed viable cystic and well-vascularized lesions, resembling human peritoneal endometriosis, in all 30 animals. After 15 days of treatment, the growth, maintenance and implant size of the lesions were suppressed in the CTZ group (Fig. 1B) as compared to the control (Fig. 1A). The histopathological characterization revealed the presence of endometrial glands and stroma, which confirmed the viability of the lesions in the control group (Fig. 1C), while in the CTZ group there was regression of the lesion areas and atrophy (Fig. 1D). These results have been reinforced by the measurements of the weight and area of the lesions before and after treatment. Prior to treatment there were no

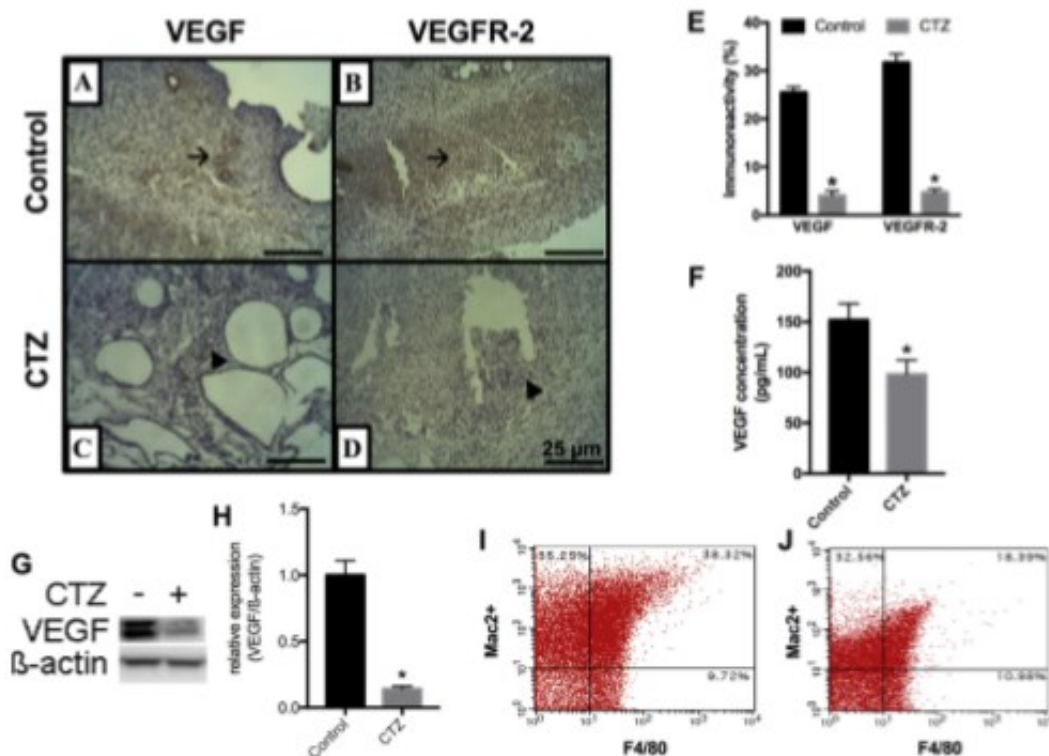


Fig. 2. Anti-angiogenic effect of CTZ on endometriotic lesions. Ten samples of each group, control and CTZ, were randomly chosen and immunostained for VEGF (panels A and C, as representative images of control and CTZ groups, respectively) and VEGFR-2 (panels B and D, as representative images of control and CTZ groups, respectively). The immunodistribution of angiogenesis markers VEGF (A and C) and VEGFR-2 (B and D) was more detected in the control group (arrow) than in CTZ group (arrowheads), being confirmed by the morphometric analysis (panel E; $n = 10$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, two-way ANOVA followed by Dunnett's t -test). VEGF concentration was evaluated by ELISA immunoassay in the peritoneal washing of eight randomly selected animals from each group (panel F; $n = 8$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, Student's t -test). For Western blots, five randomly selected samples from each group were used. Panel G: representative Western blot analysis of the effects of CTZ treatment on the expression of VEGF protein. Panel H: quantification of the Western blots represented on panel G ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, Student's t -test). FACS analysis showed a reduction of the macrophage phenotype (Mac-2 + F4-80+) in the treated group (J) than the control group population in the peritoneal fluid (I). The individual values that generated panels E, F and H are presented in supplementary material (Table S1).

differences between groups (weight: control: 0.59 ± 0.04 g vs CTZ: 0.61 ± 0.04 g; lesion area: control: 5.98 ± 0.07 mm² vs CTZ: 6.01 ± 0.05 mm²), but the CTZ group was significantly smaller after treatment (Fig. 1E and F, $P < 0.05$, Student's t -test).

3.2. CTZ treatment inhibits angiogenesis process

VEGF and VEGFR-2 immunoreactivity was detected in the endometriotic lesions, mainly in the stroma, in the cytoplasm of endothelial cells and around the glands (Fig. 2A, B, 2C and 2D). The distribution of angiogenic markers (histomorphometry evaluations) significantly decreased in CTZ group compared to the control (Fig. 2E). ELISA analysis revealed a decrease in VEGF concentration in the peritoneal washings (Fig. 2F) and Western blot analysis (Fig. 2G and H) demonstrated suppression of the expression of VEGF in the endometriotic lesions treated with CTZ as compared to the control group ($P < 0.05$, Student's t -test). In addition, CTZ (Fig. 2J) also decreased the number of macrophage positive cells (Mac-2 + F4-80+) in about 50% compared to the control group in the peritoneal fluid (Fig. 2I). Taken together, these results strongly suggest an important anti-angiogenic effect of CTZ in the endometriosis lesions.

3.3. CTZ interferes with growing signal

CTZ treatment significantly increased the expression of ERK1/2 (Fig. 3A and B, $P < 0.05$, Student's t -test). However, when ERK1/2 activation is evaluated, a different picture is observed. When comparing the non-stimulated phosphorylation of ERK1/2 on threonine 202 and tyrosine 204, it is clear that phosphorylation was already high in the control group, as compared to CTZ-treated group (Fig. 3A and C, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). Moreover, this phosphorylation observed in control was not augmented in animals that were injected with insulin 1 h prior to euthanasia. On the other hand, in CTZ-treated animals, ERK1/2 phosphorylation responded to the insulin injection as expected for a healthy responsive tissue (Fig. 3A and C, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). These results are indicative that the endometriotic lesions presented a basal growth signal that was abolished by CTZ treatment.

3.4. CTZ affects cell survival and proliferation mediators

The treatment with CTZ decreased the expression of both AKT and ACLY as compared to control (Fig. 4A and B, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). The phosphorylation of AKT

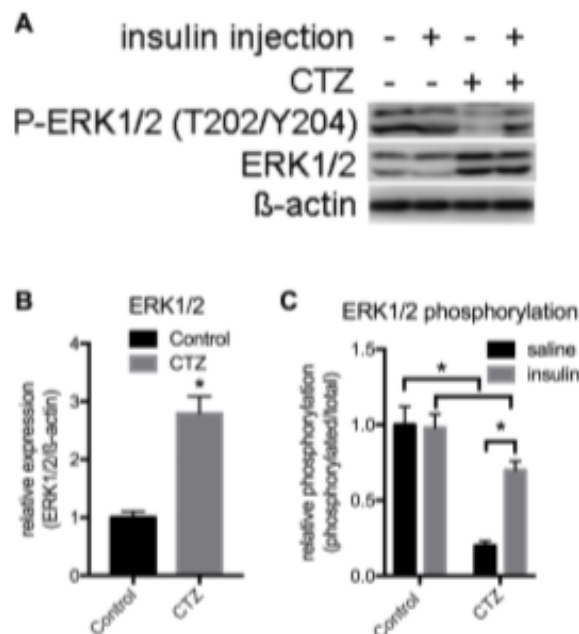


Fig. 3. Effects of CTZ treatment on ERK1/2 expression and phosphorylation. Protein levels and phosphorylation of ERK1/2 were evaluated by Western blot analysis of 5 randomly selected samples from each group. Panel A shows a representative Western blot of total and phosphorylated ERK1/2. Panel B: quantification of total ERK1/2 expression relative to β-actin used as load control ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, Student's *t*-test). Panel C: quantification of the levels of phosphorylated ERK1/2 relative to total ERK1/2 staining ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, two-way ANOVA followed by Dunnett's *t*-test). The individual values that generated panels B and C are presented in supplementary material (Table S1).

on serine 473, which is mediated by mTORC2, was strongly diminished upon CTZ treatment (Fig. 4B, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). Consequently, phosphorylation of ACLY on serine 455, which is mediated by AKT, was also diminished by CTZ treatment (Fig. 4B, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test).

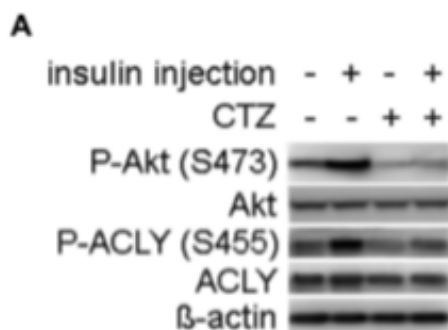


Fig. 4. Effects of CTZ treatment on AKT and ACLY expression and phosphorylation. Protein levels and phosphorylation of AKT and ACLY were evaluated by Western blot analysis of 5 randomly selected samples from each group. In panel A is shown a representative Western blot of total and phosphorylated ERK1/2. Panel B: quantification of total expression relative to β-actin used as load control and phosphorylation relative to total protein of AKT and ACLY ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ between the bars indicated by the brackets, two-way ANOVA followed by Dunnett's *t*-test). The individual values that generated panel B are presented in supplementary material (Table S1).

3.5. CTZ down regulates stress markers and acts as an anti-inflammatory modulator

Treatment with CTZ decreased the expression of AMPK and its downstream mediator ACC (Fig. 5A and B, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). However, phosphorylation of these metabolic cell stress markers was improved by the treatment with CTZ (Fig. 5C, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test). PERK, another marker of cell stress but from the unfolded protein response pathway, was also more activated (phosphorylated) upon CTZ treatment (Fig. 5C, $P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Dunnett's post-test) but with no changes on its total expression (Fig. 5B). The pro-inflammatory marker TNF-α was also down-regulated in the endometriotic lesions of CTZ-treated animals (Fig. 5A and B). This is accompanied by a decrease in the concentration of PGE₂ (Fig. 5D), a major signal for the development of endometriotic lesion. The levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine normally increased in endometriotic lesions, were also reduced in endometriotic lesions treated with CTZ as compared to the control group (Fig. 5E).

3.6. No toxicity was observed in CTZ treated animals

No evidence of toxicity was noted for the CTZ dose administered based on body weight compared with controls (Fig. 6A). There were no significant differences between the liver weights (Fig. 6B), nor serum AST and ALT (Fig. 6C), glycemia (Fig. 6D) and insulinemia (Fig. 6E) between the treated CTZ group and control. In addition, in the hematologic analysis with peripheral blood, we observed an accentuated lymphocytosis in control animals, while in the treated group there was a recovery in the leukocytes number with normal parameters (Fig. 6F). So, the toxicity assessments used in this study did not reveal any toxic effects induced by CTZ.

4. Discussion

Endometriosis frequently produces serious effects on social and marital life, because it is often associated with infertility, and severe and incapacitating painful symptoms (Bulun, 2009; Fourquet et al., 2010). It is hoped that new approaches will be developed to improve endometriosis treatment. In the current work, we have provided evidence for the pharmacological use of CTZ for the treatment of endometriosis. The current pharmacological treatment approaches for endometriosis are largely focused on creating a hypoestrogenic or progestin dominated environment and relieve pelvic pain (Rubland et al., 2011). However, a recent systematic review has reported that

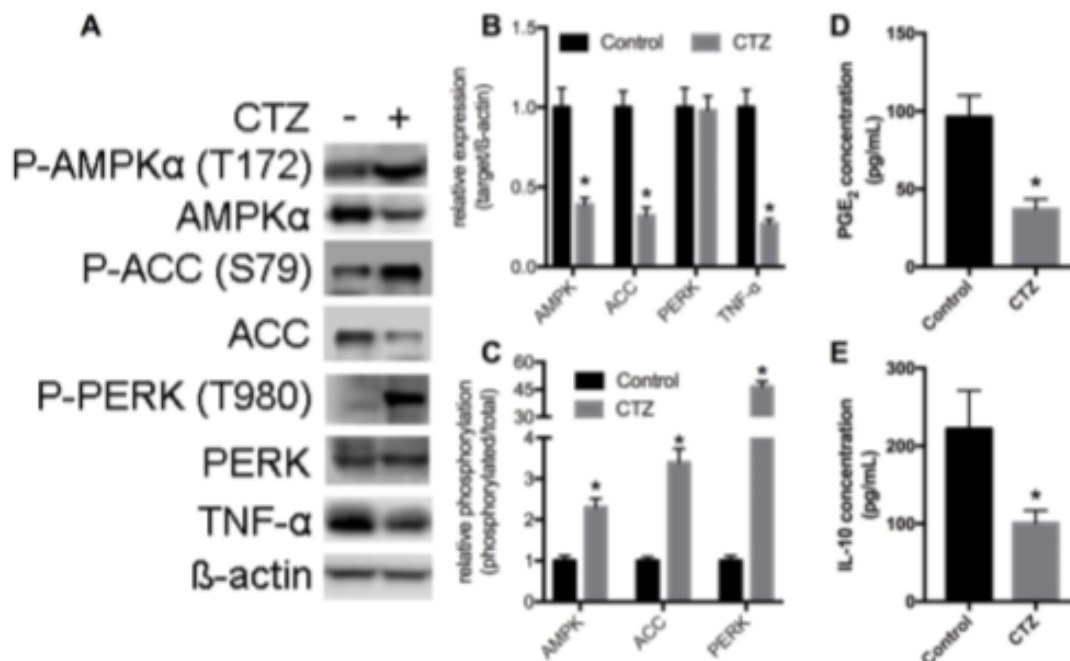


Fig. 5. CTZ induces intracellular stress and acts as an anti-inflammatory modulator. Protein expression of AMPK, ACC, PERK and TNF- α , and phosphorylation of AMPK, ACC and PERK were evaluated by Western blot analysis of 5 randomly selected samples from each group. A representative result is shown in panel A. Panel B: quantification of total expression of the proteins relative to β -actin used as load control ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ as compared to controls, two-way ANOVA followed by Dunnett's t -test). Panel C: quantification of the levels of phosphorylated proteins relative to total proteins staining ($n = 5$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, two-way ANOVA followed by Dunnett's t -test). Panels D and E: quantification of PGE₂ and IL-10, respectively in the serum ($n = 7$, * indicate $P < 0.05$ as compared to control, Student's t -test). The individual values that generated panels B, C, D and E are presented in supplementary material (Table S1).

many patients gained only limited alleviation from pain symptoms (Becker et al., 2017). In addition, for all the patients, particularly those wishing to conceive, the side effects of medication treatments are unacceptable (Bedaiwy et al., 2016). Our results here indicate that CTZ treatment is able to reduce lesions size. Based on the morphological studies, we observed a reduction in the endometriotic lesion with regression and atrophy in the animals treated with CTZ and, importantly, without signs of drug toxicity. The dose of 200 mg/kg CTZ used in our study was equivalent to those reported in previous experimental models and it was without considerable adverse reaction or expressive variation in hepatic or blood parameters (De Franceschi et al., 1994; Khalid et al., 2005; Rufo et al., 1997; Takei et al., 2003; Wang et al., 2014). Moreover, we used a relatively short treatment, and it is possible that a longer treatment (plus one or two weeks) would lead to the complete reversion of the picture.

The contribution of new blood vessels is fundamental for the development and sustainability of the endometriotic lesion, drawing attention to the importance of angiogenesis that will provide a substrate for cell survival (Taylor et al., 2009). Many studies have reported the up-regulation of VEGF and VEGFR associated to endometriosis and their importance to the progression of the disease (Braza-Bouls et al., 2014; Marf-Alexandre et al., 2015; Ramm et al., 2011). Therefore, anti-angiogenic agents are discussed as possible candidates for new therapeutic approaches (Becker and D'Amato, 2007; Nap et al., 2004). In our study, VEGF and VEGFR-2 expression were downregulated in CTZ group as compared to control. This anti-angiogenic effect of CTZ had previously been described in different models of tumor growth (Belo et al., 2004; Takei et al., 2003). These observations are important because the VEGF/VEGFR-2 signal enhances endothelial cell migration and proliferation (Ferrara et al., 1992) being essential conditions for the lesions maintenance and growth (Cardoso et al., 2017; Machado et al., 2008).

The mechanism by which endometriotic lesions up-regulate angiogenesis have been frequently associated to two different mechanisms: an increased level of pro-inflammatory cytokines that increase local inflammation and its consequent up-regulation of PGE₂, which directly promotes angiogenesis (Kim et al., 2013; Machado et al., 2010; Sacco et al., 2012; Szade et al., 2015). Our results here show that the treatment of the animals with CTZ reduced inflammation (evaluated by means of TNF- α levels) and PGE₂ levels. PGE₂ promotes the production of estrogen by endometriotic cells and its elevated levels are directly associated with the progression of the disease (Sacco et al., 2012). Moreover, TNF- α is normally elevated in endometriotic lesions due to its secretion by the increased infiltrated macrophages (Kurt et al., 2015). We also observed a decrease in macrophage infiltration upon the treatment with CTZ, which is consistent with the TNF- α results. Moreover, TNF- α is described to promote the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in macrophages (Sacco et al., 2012). COX-2 is an enzyme responsible for the synthesis of PGE₂ (Sacco et al., 2012) and, thus, the decrease in macrophage infiltration promoted by CTZ might be responsible for the lower levels of TNF- α and PGE₂ observed here. The altered function of the local immune system cells and cytokines profile is characteristic of endometriosis (Ahn et al., 2015). Notably, macrophages are important immune cells contributing to this dysregulation because they can produce both pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines (Burney and Giudice, 2012; Capobianco and Rovero-Querini, 2013; Machado et al., 2016; Scheerer et al., 2016; Takebayashi et al., 2015). Therefore, the fact that the treatment of the animals with CTZ reduced in macrophage infiltration accompanied by the decrease in TNF- α and PGE₂ support the efficacy of the drug to treat endometriosis.

In spite of the fact that endometriosis promotes local and systemic inflammation, it has been reported the occurrence of elevated serum levels of IL-10, a markedly anti-inflammatory cytokine, in patients with

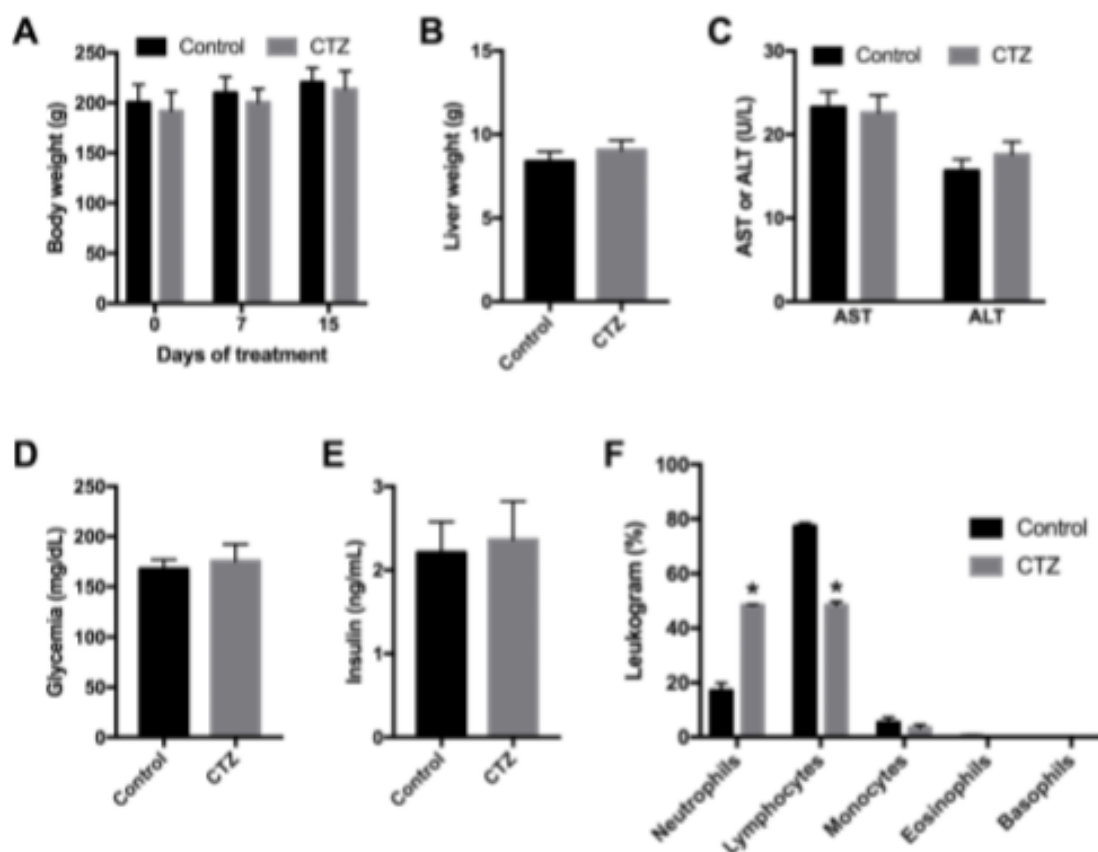


Fig. 6. No toxicity was observed in CTZ treated animals. No evidence of toxicity was noted between the treated CTZ group and the control based on body weight (A), liver weight (B), serum AST and ALT (C), glycemia (D) and insulina (E). In the hematologic analysis using peripheral blood, an accentuated lymphocytosis on the control animals was noted, while in the treated group there was a recovery in the leukocytes number with normal parameters (F). All the measurements were performed in all the animals (n = 15).

endometriosis (Suen et al., 2014). The importance of this cytokine to the progress of the disease is evident since, in a rat model for endometriosis, depletion of IL-10 considerably decreased the size of the endometriotic lesions and, conversely, administration of IL-10 promoted the growth of the lesions (Suen et al., 2014). This effect might be due to the putative effect of IL-10 on the immunity of the patients preventing the immune system to control the progression of the endometriotic lesions. Nevertheless, the fact that the treatment with CTZ reduced the levels of IL-10 substantiates the effects of the drug against endometriosis and corroborates its clinical use for the control of the disease.

Although the etiology and pathogenesis of endometriosis remain uncertain, a recent study highlighted the ERK1/2 are significant effectors on the development of the disease (Uimari et al., 2017). The current work shows that ERK1/2 expression is down-regulated in CTZ-treated rats, as compared to controls. Isolated, this result is encouraging *per se*. Nonetheless, we also observed that, in control rats, ERK1/2 is over phosphorylated even in a non-stimulated condition (no insulin injected previous to the euthanasia) and that insulin does not augment this phosphorylation. This is a strong indicator that ERK1/2 is constitutively activated in endometriotic lesions and corroborate the major role of ERK1/2 on the progression of the disease. Intriguingly, the treatment of the animals with CTZ not only reduced the expression of ERK1/2 but also reduced to very low levels the unstimulated phosphorylation of the enzyme. Moreover, CTZ-treated mice recovered the responsiveness to insulin on regard of ERK1/2 phosphorylation that was not observed on control rats. This result is a strong indicator that

the treatment reversed the previously reported dysregulation of the expression of ERK1/2 (Afshar et al., 2013).

Other signaling pathways were also affected by CTZ treatment, such as mTORC2/AKT signaling. Although we have not evaluated mTOR, phosphorylation of AKT on serine 473 is mediated by the mTORC2. Our results reveal that this phosphorylation of AKT is strongly attenuated upon CTZ treatment. We have previously shown that CTZ is a direct inhibitor of PI3K (Purtado et al., 2015), another upstream activator of AKT. This effect is corroborated by the phosphorylation of ACLY, which is a substrate for AKT and is involved in cell proliferation, and followed a similar pattern observed for AKT phosphorylation upon CTZ treatment. These effects are observed for non-stimulated and insulin-stimulated rats, suggesting that the whole signalization is affected by the treatment. In endometriotic lesions, mTOR is activated suppressing autophagy and decreasing endometriotic cells apoptosis (Choi et al., 2015). Indeed, CTZ promotes cellular stress, such as revealed by the activation of the nutrient sensor AMPK and its downstream effector ACC. Moreover, the increased phosphorylation of PERK, an ultimate UPR effector, suggests that the endoplasmic reticulum stress is also triggered upon the treatment. Thus, by interfering with these pathways, CTZ might also contribute to the induction of apoptosis of the endometriotic cells, as well as to the reduction on these cells proliferation, resulting in the reversion of the progress of the disease.

CTZ is a well-tolerated drug, majorly used to treat oral and vaginal candidiasis (Crowley and Gallagher, 2014). Presented as different formulations and brands, CTZ is one of the top pharmaceuticals of gynecological use worldwide (Crowley and Gallagher, 2014). When orally

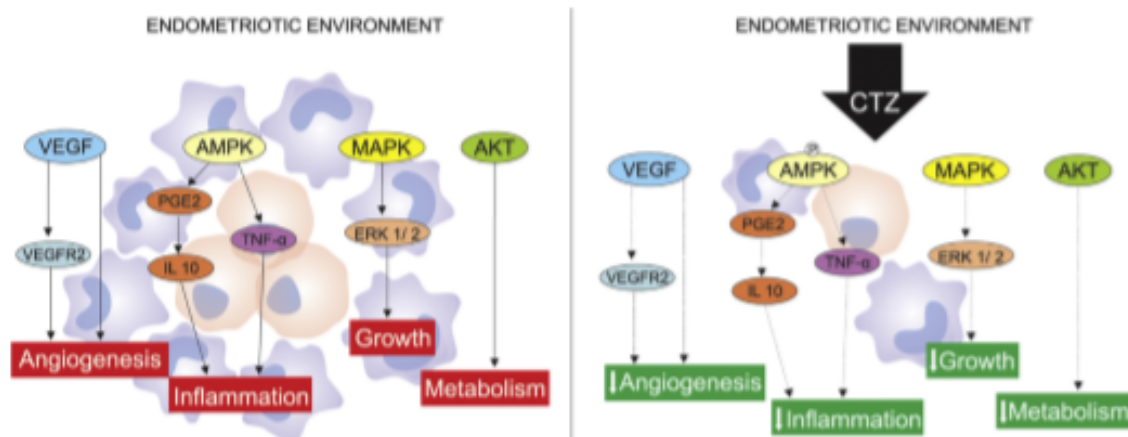


Fig. 7. CTZ signaling pathways in endometriotic microenvironment. In the endometriotic microenvironment, the macrophages polarization signals are essential to promote the angiogenesis process, inflammation and the growth because it leads to upregulation the VEGF, AMPK and MAPK pathways. Besides that, the AKT pathways are also activate and promotes metabolisms changes. CTZ downregulating these pathways and decrease the number of activated macrophages resulting in the suppresses of the target signals and interfering in the survival and growth of endometriotic lesion.

administered, cases of elevated hepatic enzymes and irritation of the gastrointestinal tract have been reported (Ellepola and Samaranyake, 2000). Recently, we have developed a nanoformulation of CTZ aimed to circumvent these possible side effects (Marcondes et al., 2015). However, in the current study, we administered the drug orally to the rats without alterations of hepatic enzymes in the serum. This is a strong indication that CTZ is not promoting hepatic damage to the animals and support its utilization to control endometriosis.

Finally, based on the results of this and previous studies, we demonstrated that the angiogenic factor VEGF and that the AMPK, MAPK and Akt pathways are involved in the pathogenesis of endometriosis. We also propose a CTZ molecular mechanism on the reduction of the lesions in experimental endometriosis (Fig. 7). We know that the molecular mechanisms are complex, but in our opinion, the macrophage plasticity and their ability to modulate essential survival and invasion pathways is the key to a better understanding of the malignant behavior of endometriosis. In the endometriotic microenvironment, the macrophage polarization signals are essential to promote the angiogenesis process, inflammation and the growth because it leads to upregulation of VEGF expression and the AMPK and MAPK pathways. In addition, the Akt pathway is also activated and promotes metabolism changes. On the other hand, CTZ decreases the number of activated macrophages on the lesions resulting in the suppression of these target signals of growth, metabolism, inflammation and angiogenesis. These actions interfere in the survival and invasion of endometriotic lesions.

In conclusion, we demonstrated that CTZ has antiangiogenic and anti-inflammatory activities, which produced the regression of endometriotic lesions. The main CTZ mechanism of action was to decrease the presence of the activated macrophages in the lesions leading to the reduction of VEGF expression, as well as the downregulation of proliferative and survival signaling pathways. In addition, no toxicity was observed in the animals treated with CTZ, a relevant fact for a possible clinical treatment for endometriosis patients. The results of this study suggest the use of CTZ as an effective pharmacological treatment for endometriosis, and we are optimistic that these effects will be reproducible in clinical tests.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

Authors wish to express their gratitude to Dr. Patricia L. Mitchell for English editing of the manuscript. The current work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2018.04.005>.

References

- Adinolfi, B., Carpi, S., Romanini, A., De Pozzo, E., Castagna, M., Costa, B., Martini, C., Oleson, S.P., Schmitt, N., Breschi, M.C., Nieri, P., Fogli, S., 2015. Analysis of the antitumor activity of clotrimazole on A375 human melanoma cells. *Anticancer Res.* 35, 3781–3786.
- Alshar, Y., Hastings, J., Roqueiro, D., Jeong, J.-W., Giudice, L.C., Fazleabas, A.T., 2013. Changes in endometrial gene expression during the progression of experimental endometriosis in the baboon, *Papio anubis*. *Biol. Reprod.* 88 (44). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.104497>.
- Ahn, S.H., Moosanto, S.P., Miller, C., Singh, S.S., Thomas, R., Tayade, C., 2015. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *BioMed Res. Int.*, 795976 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2015/795976>.
- Armstrong, A.W., Voyles, S.V., Armstrong, E.J., Fuller, E.N., Rutledge, J.C., 2011. Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J. Dermatol. Sci.* 63, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.04.007>.
- Becker, C.M., D'Amato, R.J., 2007. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. *Microwasc. Res.* 74, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.04.008>.
- Becker, C.M., Gattrell, W.T., Guke, K., Singh, S.S., 2017. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. *Fertil. Steril.* 108, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2017.05.004>.
- Bedaiwy, M.A., Allaire, C., Yong, P., Alfaraj, S., 2016. Medical management of endometriosis in patients with chronic pelvic pain. *Semin. Reprod. Med.* 35, 38–53. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597308>.
- Belo, A.V., Barcelos, L.S., Teixeira, M.M., Ferreira, M.A.N.D., Andrade, S.P., 2004. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice. *Canc. Invest.* 22, 723–729. <https://doi.org/10.1081/CNV-200032992>.
- Beste, M.T., Piffle-Doyle, N., Prentice, E.A., Morris, S.N., Lauffenburger, D.A., Isaacson, K.B., Griffith, L.G., 2014. Molecular network analysis of endometriosis reveals a role for c-Jun-regulated macrophage activation. *Sci. Transl. Med.* 6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007988>.
- Braza-Bols, A., Mari-Alexandre, J., Gilibert, J., Sánchez-Izquierdo, D., España, F., Estellés, A., Gilibert Estellés, J., 2014. MicroRNA expression profile in endometriosis

- its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum. Reprod.* 29, 978–988. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep019>.
- Brinton, L.A., Sakoda, L.C., Sherman, M.E., Frederiksen, K., Kjaer, S.K., Gesslbard, B.I., Olsen, J.L., Mellemkjaer, L., 2005. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14, 2929–2935. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI.05-0394>.
- Bulun, S.B., 2009. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 360, 269–279. <https://doi.org/10.1056/NEJMe0806690>.
- Burney, R.O., Giudice, L.C., 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 98, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2012.06.029>.
- Capobianco, A., Rovere-Querini, P., 2013. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00009>.
- Cardias Pires, T.R., Albanese, J.M., Schwab, M., Maretti, A., Carvalho, R.S., Sola-Penna, M., Zancan, P., 2017. Phosphofructokinase-2 modulates p44/42 MAPK levels in HeLa cells. *J. Cell. Biochem.* 118. <https://doi.org/10.1002/jcb.25774>.
- Carvalho, J.V., Abranches, M.S., Vianna-Jorge, R., Ferrari, R., Berardo, P.T., Machado, D.E., Perini, J.A., 2017. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. *Bar. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 209, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.10.046>.
- Carvalho, L.F.P., Samadpour, A.N., Aguiar, A., Fernandes, L.F.C., Abranches, M.S., 2012. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 286, 1033–1040. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2439-7>.
- Choi, J., Jo, M., Lee, E., Lee, D.Y., Choi, D., 2015. Diogenin enhances autophagy induction in endometriotic cells by impairing activation of AKT, ERK1/2, and mTOR. *Fertil. Steril.* 104, 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2015.05.020>.
- Chung, B.Y., Kim, S.Y., Jung, J.M., Won, C.H., Choi, J.H., Lee, M.W., Chang, S.H., 2015. The antimetabolic agent clotrimazole inhibits melanogenesis by accelerating ERK and PI3K/Akt-mediated tyrosinase degradation. *Exp. Dermatol.* 24, 386–388. <https://doi.org/10.1111/exd.12669>.
- Crowley, P.D., Gallagher, H.C., 2014. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* 117, 611–617. <https://doi.org/10.1111/jam.12554>.
- De Francesco, L., Saadane, N., Trudel, M., Alper, S.L., Brugnara, C., Beauvais, Y., 1994. Treatment with oral clotrimazole blocks Ca²⁺-activated K⁺ transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* 93, 1670–1676. <https://doi.org/10.1172/JCI117149>.
- Ellepola, A.N.B., Samarasinghe, L.P., 2000. Oral candidal infections and astinomyosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 172–198. <https://doi.org/10.1177/10454411000110020001>.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D.W., 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* 13, 18–32. <https://doi.org/10.1210/edrv-13-1-18>.
- Fouquet, J., Gao, X., Zavala, D., Oregano, J.C., Abac, S., Ruiz, A., Laboy, J., Flores, I., 2010. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. *Fertil. Steril.* 93, 2424–2428. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2009.09.017>.
- Furtado, C.M., Marcondes, M.C., Carvalho, R.S., Sola-Penna, M., Zancan, P., 2015. Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anticancer action of clotrimazole. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 62. <https://doi.org/10.1016/j.ijbc.2015.03.004>.
- Furtado, C.M., Marcondes, M.C., Sola-Penna, M., de Souza, M.L.S., Zancan, P., 2012. Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030462>.
- Giudice, L.C., 2010. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 2389–2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1000274>.
- Giudice, L.C., Kao, L.C., 2004. Endometriosis. *Lancet* 364, 1789–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17403-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5).
- Hever, A., Roth, R.B., Hovest, P., Martin, M.E., Acosta, J.A., Acosta, H., Rojas, J., Herrera, R., Grigoriadis, D., White, R., Corcos, P.J., Maki, R.A., Zlotnik, A., 2007. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12451–12456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703451104>.
- Jeung, I.C., Cheon, K., Kim, M.R., 2016. Decreased cytotoxicity of peripheral and peritoneal natural killer cell in endometriosis. *BioMed Res. Int.* 2916070. <https://doi.org/10.1155/2016/2916070>.
- Khalid, M.H., Tokunaga, Y., Caputy, A.J., Walters, H., 2005. Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole. *J. Neurosurg.* 103, 79–86. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.103.1.0079>.
- Kim, Y.-W., West, K.Z., Bysova, T.V., 2013. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J. Mol. Med. (Berl.)* 91, 323–328. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1007-3>.
- Kim, Y.-W., West, K.Z., Bysova, T.V., 2013. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J. Mol. Med. (Berl.)* 91, 323–328. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1007-3>.
- Kumar, S., Munkarab, A., Arabi, H., Bandyopadhyay, S., Semaan, A., Hayek, K., Garg, G., Morris, R., Al-Fehmi, R., 2011. Prognostic analysis of ovarian cancer associated with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.017>.
- Kurt, R.K., Pinar, N., Karateke, A., Okyay, A.G., Silfeler, D.B., Albayrak, A., Oudemir, S., Hakverdi, A.U., 2015. Protective effects of melatonin in an experimental rat endometriosis model: histopathological evaluation and assessment of TNF- α levels. *Reprod. Sci.* 22, 258–263. <https://doi.org/10.1177/1933719114542029>.
- Kwak, J.Y., Park, S.W., Kim, K.H., Na, Y.J., Lee, K.S., 2002. Modulation of neutrophil apoptosis by plasma and peritoneal fluid from patients with advanced endometriosis. *Hum. Reprod.* 17, 595–600. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.595>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Laschke, M.W., Menger, M.D., 2007. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum. Reprod. Update* 13, 331–342. <https://doi.org/10.1093/humupd/umx006>.
- Machado, D.E., Abranches, M.S., Berardo, P.T., Takiya, C.M., Nasciutti, L.R., 2008. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil. Steril.* 90, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2007.05.076>.
- Machado, D.E., Berardo, P.T., Landgraf, R.G., Fernandes, P.D., Palermo, C., Alves, L.M., Abranches, M.S., Nasciutti, L.R., 2010. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil. Steril.* 93, 2674–2679. <https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2009.11.037>.
- Machado, D.E., Palumbo, A., Santos, J.M., Mattos, R.M., dos Santos, T.A., Seabra, S.H., Boldrini, L. da C., Perini, J.A., Nasciutti, L.R., 2014. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. *Histol. Histopathol.* 29, 903–912. <https://doi.org/10.14670/hh-29.903>.
- Machado, D.E., Rodrigues-Baptista, K.C., Alessandra-Perini, J., De Moura, R.S., Dos Santos, T.A., Pereira, K.G., Da Silva, Y.M., Sousa, P.J.C., Nasciutti, L.R., Perini, J.A., 2016. Hutepe oleracea extract (Açaí) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166059>.
- Marcondes, M.C., Fernandes, A.C.S., Babaiana, I., De Souza, R.O.M.A., Sola-Penna, M., Zancan, P., 2015. Nanomicellar formulation of clotrimazole improves its antitumor action toward human breast cancer cells. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130555>.
- Marcondes, M.C., Sola-Penna, M., Zancan, P., 2010. Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 497. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.013>.
- Marí-Alexandre, J., García-Oms, J., Barceló-Molina, M., Gilibert-Aguilar, J., Estelès, A., Brasa-Bols, A., Gilibert-Estelès, J., 2015. MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb. Res.* 135, 538–540. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.04.039>.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E., 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274, 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., 2009. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *BioFactors* 35, 209–235. <https://doi.org/10.1002/biot.311>.
- Nap, A.W., Griffioen, A.W., Dunselman, G.A.J., Bouma-Ter Steege, J.C.A., Thijssen, V.L.J.L., Evers, J.L.H., Groothuis, P.G., 2004. Antiangiogenic therapy for endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1089–1095. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031406>.
- Ram, L.A., Brasa-Bols, A., Gilibert-Estelès, J., Gilibert, J., Espaa, F., Chirivella, M., Estelès, A., 2011. MicroRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Hum. Reprod.* 26, 1082–1090. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep025>.
- Reid, R.M., Permuth, J.B., Sellers, T.A., 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Canc. Biol. Med.* 14, 9–32. <https://doi.org/10.20902/cbm.2016.0084>.
- Rufin, P.A., Morlin, D., Riegler, M., Ferguson-Maltzman, M.H., Dickinson, B.L., Brugnara, C., Alper, S.L., Lencer, W.L., 1997. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K⁺ conductances: demonstration of efficacy in the intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J. Clin. Invest.* 100, 3111–3120. <https://doi.org/10.1172/JCI19866>.
- Rubland, B., Agic, A., Krampe, J., Diedrich, K., Hornung, D., 2011. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review. *Minerva Ginecol.* 63, 247–249. <https://doi.org/10.6092/112073>.
- Sacco, K., Portelli, M., Pollaccio, J., Schember-Wismayer, P., Calleja-Aguil, J., 2012. The role of prostaglandin E2 in endometriosis. *Gynecol. Endocrinol.* 28, 134–138. <https://doi.org/10.3109/09513090.2011.588753>.
- Scheerer, C., Bauer, P., Chiantera, V., Schouli, J., Kaufmann, A., Mechsner, S., 2016. Characterization of endometriosis-associated immune cell infiltrates (EMAIIC). *Arch. Gynecol. Obstet.* 294, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4142-6>.
- Schulke, L., Berbic, M., Manconi, F., Tokushige, N., Markham, R., Fraser, I.S., 2009. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 24, 1695–1703. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep071>.
- Suen, J.L., Chang, Y., Chiu, P.R., Hsieh, T.H., Hsi, E., Chen, Y.C., Chen, Y.F., Tsai, K.M., 2014. Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. *Am. J. Pathol.* 184, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.023>.
- Suen, J.L., Chang, Y., Chiu, P.R., Hsieh, T.H., Hsi, E., Chen, Y.C., Chen, Y.F., Tsai, K.M., 2014. Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. *Am. J. Pathol.* 184, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.023>.
- Stade, A., Grochot-Przećek, A., Florycz, U., Jankiewicz, A., Dulak, J., 2015. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IBMB Life* 67, 145–159. <https://doi.org/10.1002/ibm.1328>.
- Takebayashi, A., Kimura, F., Kishi, Y., Ishida, M., Takahashi, A., Yamakawa, A., Wu, D., Zheng, L., Takahashi, K., Sugiyama, H., Murakami, T., 2015. Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73, 221–231. <https://doi.org/10.1111/aji.12331>.
- Takei, S., Ieda, Y., Yokoyama, M., 2003. Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats. *Int. J. Urol.* 10, 78–85. <https://doi.org/10.1046/j.1442-3042.2003.00575.x>.
- Taylor, R.N., Yu, J., Torres, P.R., Schickelzahn, A.C., Park, J.K., Mueller, M.D., Sidell, N., 2009. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod. Sci.* 140–146. <https://doi.org/10.1177/1933719108324893>.
- Umar, O., Rahmouli, N., Nyholt, D.R., Vincent, K., Müsser, S.A., Becker, C., Morris, A.P., Montgomery, G.W., Zondervan, K.T., 2017. Genome-wide genetic analyses highlight mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the pathogenesis of

- endometriosis. *Hum. Reprod.* 32, 780–793. <https://doi.org/10.1093/humrep/des024>.
- Ushio-Pakai, M., 2006. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 71, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.04.015>.
- Van Laegendroek, A., Casanas-Roux, F., Donnez, J., 2002. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil. Steril.* 77, 861–870. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)02989-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)02989-X).
- Vernon, M.W., Wilson, E.A., 1985. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil. Steril.* 44, 684–694. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)48988-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)48988-0).
- Viganò, P., Somigliana, E., Parazzini, F., Vercellini, P., 2007. Bias versus causality: interpreting recent evidence of association between endometriosis and ovarian cancer. *Fertil. Steril.* 88, 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.180>.
- Wang, J., Jia, L., Kuang, Z., Wu, T., Hong, Y., Chen, X., Lesung, W.K., Xia, J., Cheng, B., 2014. The in vitro and in vivo antitumor effects of clotrimazole on oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098885>.
- Wu, M.Y., Ho, H.N., 2003. The role of cytokines in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 49, 285–296. <https://doi.org/10.1004/j.1600-0897.2003.01207.x>.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L.-Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.-R., Jiang, B.-H., 2007. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Canc. Res.* 67, 10823–10830. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CCR-07-0783>.
- Zhou, X., Li, T., Fan, S., Zhu, Y., Liu, X., Guo, X., Liang, Y., 2016. The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* 59, 419–428. <https://doi.org/10.1111/myc.12485>.

6.2. EFEITOS DO CLOTRIMAZOL NA VIA DE PRODUÇÃO DO ESTROGENIO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE

Visto que a endometriose é uma doença estrogênio dependente, avaliamos o efeito do CTZ na via de produção de estrogênio modelo experimental de endometriose. Os animais foram divididos em 4 grupos: tratado com CTZ (20mg/kg/dia) via oral (N=15), controle via oral (N=15), tratado com CTZ (20mg/kg/dia) via intraperitoneal (N=10) ou controle via intraperitoneal (N=10), por 15 dias consecutivos. O CTZ diminuiu o tamanho das lesões, confirmado por exame histológico mostrando atrofia glandular. Para avaliação dos níveis de estrogênio local e circulante, foi realizada imunohistoquímica com marcação para o ER α e para aromatase e ELISA para análise dos níveis séricos de estrogênio. O CTZ mostrou-se supressor da produção de estrogênio, pois observou-se menor concentração de ER α e aromatase no grupo tratado (46,5 % e 7,19%, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (68,1% e 7,19%, respectivamente), além disso, os níveis séricos de estrogênio no grupo tratado também foi menor (10,35 pg/ml) quando comparado ao controle (19,62 pg/ml). Dessa forma, foi possível verificar a ação do CTZ na via de produção de estrogênio, com efeito específico na enzima aromatase, promovendo redução local e sistêmica dos níveis de estrogênio, além de regredir o tamanho das lesões e conseqüentemente a progressão da doença.

Os resultados deste estudo serão submetidos para publicação na revista *Fertility and Sterility*, fator de impacto 4.803.

Clotrimazole promotes reduction in estrogen levels by aromatase inhibition in endometriosis model.

Erika Menezes de Mendonça^{1,2,#}, Daniel Escorsim Machado^{1,3,#}, Jessica Alessandra-Perini^{1,3}, Luiz Eurico Nasciutti³, Mauro Sola-Penna⁴, Patrícia Zancan⁵, Jamila Alessandra Perini^{1,2,*}

[#]Authors contributed equally to this work.

Affiliations

¹Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LAPESF), Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

³Programa de Ciências Morfológicas (PCM), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁴Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo (LabECoM), Departamento de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFar), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁵Laboratório de Oncobiologia Molecular (LabOMol), Departamento de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFar), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

***Correspondence:** Jamila Alessandra Perini, Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av.

Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, 23070-200, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (Fax: 55 21 2332-7533 E-mail: jamilaperini@yahoo.com.br).

Abstract

This study investigated the effect of clotrimazole on the estrogen production pathway in endometriosis, hormone responsible for the disease progression. Endometriosis was induced in female Wistar rats by autologous transplantation and, then treated with CTZ (200mg/kg) or vehicle for 15 consecutive days, both orally and intraperitoneally. The CTZ treatment decreased the size of the lesions, confirmed by histological examination showing glandular atrophy in both drug route of administration. Moreover, was observed a reduction in the expression of the estrogen receptor and the aromatase enzyme in endometriotic lesions of CTZ treatment group compared with control. In addition, serum estrogen levels also decreased after CTZ treatment. In conclusion, CTZ acts in the estrogen production pathway, probably by inhibiting the enzyme aromatase, promoting systemic and local reduction in estrogen levels, besides to regress the endometriotic lesions size and consequently the disease progression.

Keywords: Endometriosis, Treatment, Clotrimazole, Estrogen.

Introduction

Endometriosis is an estrogen dependent disease, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity (1- Giudice, 2010). Its prevalence is estimated at 10-15% in women of reproductive age (2- Buck et al., 2011; 3- Acién & Velasco, 2013) and it is often associated with clinical symptoms including chronic pelvic pain, dysmenorrhea, dyspareunia and infertility (4- Fauconnier et al., 2013). The

prevalence increases to 35-50% in infertile women and is considered one of the most common gynecological diseases (2- Buck et al., 2011; 3- Ación & Velasco, 2013).

Some risk factors such as age, family history, alcohol consumption, smoking and primarily the high level of estrogen are associated with the development of endometriosis (5- Parazzini et al, 2017; 6- Vigano et al, 2004; 7- Hemmert et al, 2018). Several studies demonstrated the growth of the lesions is related to the action of estrogen, while the reduction of the hormone at menopause, during pregnancy or by the pharmacological suppression of endogenous secretion usually reduces the disease (8- Huhtinen et al, 2012; 9- Vercellini et al, 2016; 10- Marie-Scemama et al, 2019). Naqvi *et al* (2014) showed that a selective estrogen receptor modulator (BZA) inhibits the action of estrogen on endometrial cell proliferation in an experimental model of endometriosis, confirming that estrogen aids in the cellular proliferation of endometriosis (11-Naqvi et al, 2014).

One of the most important pathways responsible for the increase estrogen in patients with endometriosis is associated with aromatase enzyme (12- Mori et al, 2018), a *CYP19* gene product that is part of the cytochrome P450 family. Therefore, this enzyme acts for the conversion of testosterone and androstenedione to estradiol (E2) and estrone (E1) respectively, increasing production of estrogen and disease progression (12- Mori et al, 2018).

The current pharmacological treatment for endometriosis act by suppressing ovarian function, including the use of GnRH agonists, progesterone oral contraceptives and aromatase inhibitors (9- Vercellini et al, 2016; 13- Lindsay et al, 2015). However, these treatments are associated with negative side effects, as a weight gain, muscle cramps, acne, seborrhea, depression, flushing, urogenital atrophy, loss of libido and decrease in bone mass (13- Lindsay et al, 2015; 14- Vercellini et al, 2009; 15- Becker et

al, 2017). However, women wanting to get pregnant can not use hormonal contraceptives for endometriosis treatment (12- Mori et al, 2018; 16- Piccinato et al, 2018; 17- Bedaiwy et al, 2016). Despite the options of drug treatment, there are many side effects and the gold therapeutic approach currently used in endometriosis treatment still is surgery for the detection and removal of lesions (18- Kho & Abrão, 2012). Therefore, the search for effective drug therapies with fewer adverse effects, alone or in combination, is an essential step to increase the disease management.

Clotrimazole (CTZ) is an antifungal widely used in clinical practice for the treatment of candida and other fungal infections (19- Crowley and Gallagher, 2014). Recently, our group showed that CTZ is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for endometriosis, significantly decreased the growth and the size of the implants, due to the anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of the drug (20- Machado et al, 2018). Studies have elucidated that CTZ can also inhibit the aromatase enzyme in humans (21- Trösken et al, 2004). Interestingly, an increased expression of the aromatase enzyme leads an upregulating levels of prostaglandin E₂ (PGE₂) and others inflammatory mediators (22- Bulun et al, 2001), that are involved in the pathogenesis of the disease (23- Machado et al, 2010; 24- Machado et al, 2016; 20- Machado et al, 2018; 25- Mattos et al, 2019).

Therefore, the present study investigated the CTZ effect on the estrogen produce pathway, specifically in the enzyme aromatase, and consequently on the estrogen levels in experimental model of endometriosis.

Materials and methods

Experimental model of endometriosis

Animals were treated in accordance with protocols approved by the State University of West Zone (UEZO), with guidelines from the Ethics Commission on Animal Use (CEUA – 009/2014). Female Wistar rats (8-weeks-old and 200 g) were used to test CTZ in the experimental endometriosis, as previously described (23- Machado et al, 2010; 24- Machado et al, 2016; 20- Machado et al, 2018; 25- Mattos et al, 2019). Animals were anesthetized (ketamine and xylazine), the abdomen was opened and one uterine horn was removed, segmented and split longitudinally into two pieces and implanted into the ventral abdominal wall by sutures. The abdomen was closed and animals were allowed to recover from anesthesia.

Clotrimazole treatment

After fifteen days, ventral midline laparotomy was performed to evaluate the viability and the size of endometrial explants. Rats were randomly divided into four groups: treated with CTZ (20 mg/kg body weight, Clotrimazole, Sigma Chemicals 129 Co., St. Louis, MO, USA) diluted in sunflower oil (i) gastric tube (n= 15) or (ii) intraperitoneally (n= 10); and control group received sunflower oil as vehicle by (iii) gastric tube (n= 15) or (iv) intraperitoneally (n= 10). All treatments were administered daily for 15 consecutive days. Body weight was measured at the start of treatment (day zero, D0), on the seventh day of treatment (D7) and on the last day of treatment (D15), when the animals were euthanized by anesthesia overdose. The endometriosis lesions were counted, weighed, measured (length x width) and collected for histological and immunohistochemical analysis. The blood samples were collected for analysis of serum estrogen dosage. All assessments were made without taking into account estrous stage.

Histology, immunohistochemistry and morphometric analysis

Peritoneal lesions were fixed in buffered formalin, embedded in paraffin and cut into 4-micrometers-thick sections. Part of the sections were stained with Harris hematoxylin and eosin (HE) and the other were placed on silane-treated slides and incubated overnight with the following antibodies: monoclonal antibody against ER α , sc-8005 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and monoclonal antibody against CYP19A1, ab-18995 (abcam discover more, abcam, Cambridge, USA), both at 1:100 dilution. Then, revealed using LSAB2 Kit HRP, rat (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA, USA) with diaminobenzidine (3,3' - diaminobenzidine tablets; Sigma, St. Louis, MO, USA) as the chromogen and counterstained with hematoxylin. For each case, negative control slides were incubated with antibody vehicle or no immune rabbit or mouse serum.

All samples were evaluated by two blind observers under light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Coolpix 990; Nikon, Tokyo, Japan) in a magnification of 400x. Immunostained sections (ten fields) were randomly chosen and captured from each specimen with each antibody. Using high quality captured images (2048 x 1536 pixel buffer) and the Image Pro Plus 4.5.1 program (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) the quantification of samples were performed. Histologic scores (H) for ER α and CYP19A1 were calculated using the formula $H = \sum Pi$, where I is the intensity ranging from 0 (negative cells) to 3 (deeply staining cells) and P is the percentage of staining cells for each given i, with P values of 1, 2, 3, 4, and 5 indicating 85%, and 100% positive-staining cells, respectively, as previously described (24- Machado et al, 2016; 20- Machado et al, 2018; 25- Mattos et al, 2019). The staining result was expressed as mean \pm standard deviations.

Estrogen levels

Blood samples were taken directly from the heart and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to extract the serum for hormonal profile analysis. The serum estrogen levels was assayed in duplicate using an Elisa kit manufactured by Diagnostics Biochem Canada Inc (DBC) and were calculated from standard curves performed by an automatic plate reader (Spectra Max; Molecular Devices, Sunnyvale, Calif) controlled by SoftMax software (Molecular Devices).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviations (SD) and the statistical analyses were performed with Student's t-test. For ER α and CYP19A1 morphometric analysis, statistical calculations were carried out with use of the Stat Xact-5 software program (CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA). Significance for all statistical comparisons was set at $p < 0.05$.

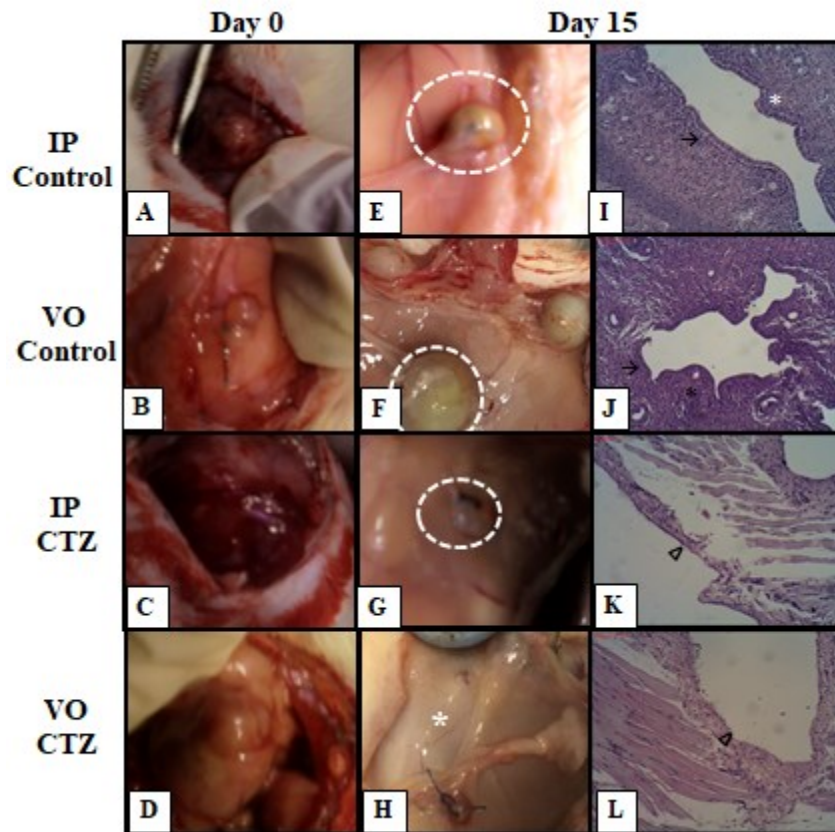


Fig 1. CTZ decrease endometriosis lesions growth. Endometriotic lesions control (A-B and E-F) and treated with CTZ (C-D and G-H) by intraperitoneal and oral revealed with hematoxylin and eosin coloration (I-L). Control endometriosis showed the presence of endometrial glands (arrows) and stromal cells (*). In the treated animals, the maintenance of the lesions was suppressed and an important atrophy of glands was observed (arrowhead). Magnification X200.

Results

Clotrimazole reduces lesions of endometriosis

After 15 days of autologous transplantation (Day 0), endometriotic lesions were cystic and well vascularized in all animals (**Fig. 1**). At the end of treatments (Day 15), the maintenance, growth and implant size of the lesions significantly decreased both in the oral and intraperitoneally treated group (**Fig. 1 E-H**). The viability of the lesions of the control group was confirmed by histopathological analysis, which shows the presence of glands and stroma, characterizing endometrial tissue (**Fig. 1 I and J**). Atrophy and regression of lesions in the CTZ treated group was also confirmed by histological analysis (**Fig. 1 K and L**). As there was no significant difference between the intraperitoneal and oral treatment groups in growth and endometriotic lesions size, the following analyzes to elucidated the CTZ mechanism were performed only with the group treated orally, due to the advantage of the route of administration.

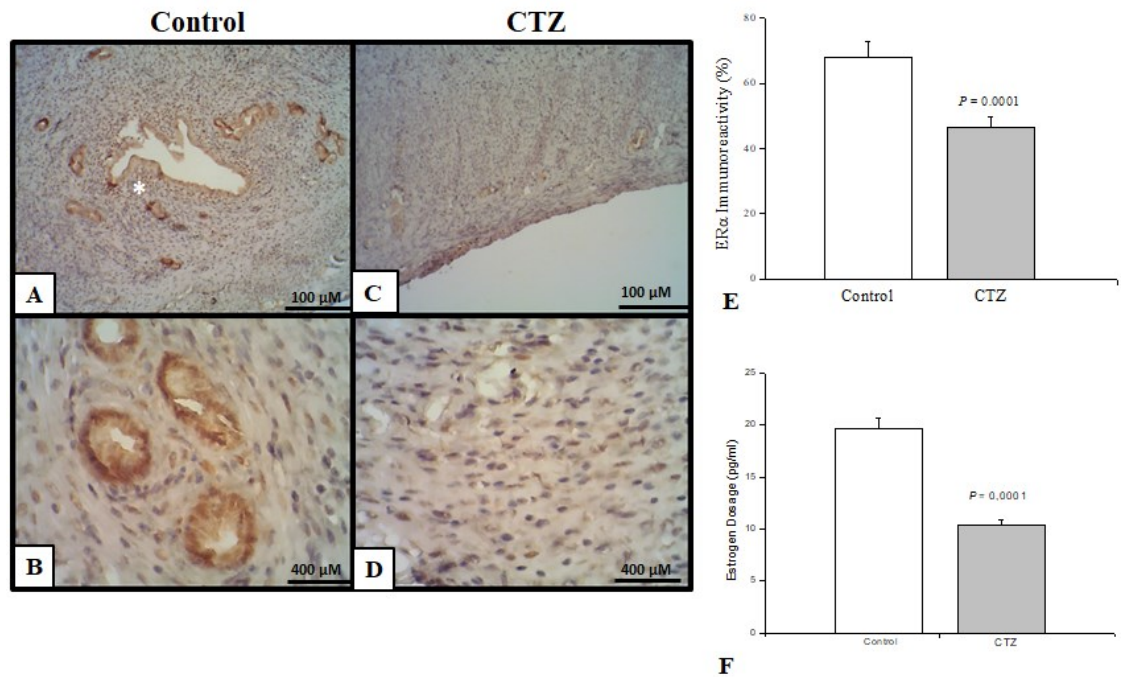


Fig 2. CTZ suppresses estrogen in endometriosis. Immunohistochemical marking for ER α in endometriosis lesions (A-D). There was greater labeling for ER α in the control group (A and B) detected predominantly in the stroma (*), primarily around the glands. CTZ treated endometriotic lesions (C and D) exhibited a significant decrease in reaction intensity (\rightarrow), being confirmed by morphometric analysis (E). The concentration of serum estrogen dosed by the ELISA method in the control group was also higher when compared to the treated group (F). ($P < 0.05$, Student's t-test).

CTZ suppresses ER α expression and the estrogen levels in experimental endometriosis

ER α immunoreactivity was detected in endometriosis lesions, mainly in the nucleus of glandular epithelial cells and more diffusely in the stroma around the glands. The immunodistribution of this marker was significantly lower in the CTZ treated group (Fig. 2 C-D) when compared to the control group (Fig. 2 A-B). These observations were confirmed by histomorphometric analysis (Fig. 2 E). In addition, we also observed that

CTZ treatment significantly reduced serum estrogen levels in the animals compared to the controls (**Fig.2 F**).

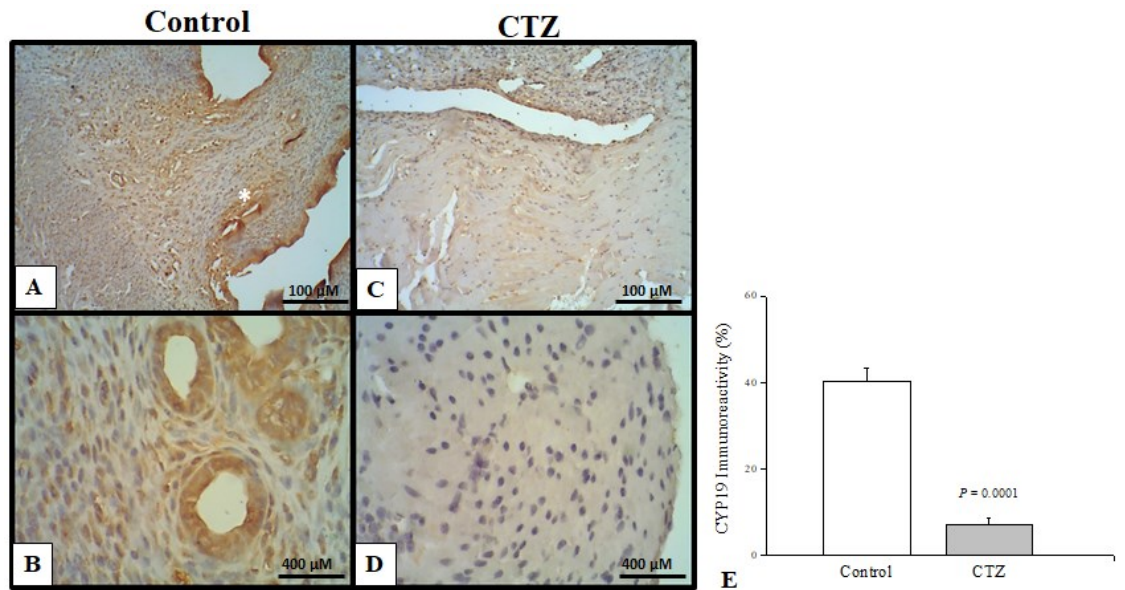


Fig 3. Aromatase enzyme is reduced with CTZ treatment in endometriosis in vivo. Immunohistochemical marking for CYP19 (arom) in endometriotics lesions (A-D). There was greater labeling for CYP19 in the control group (*) (A and B), than in the group treated with CTZ (→) (C and D), being confirmed by morphometric analysis (E). ($P < 0.05$, Student's t-test).

CTZ treatment decreases CYP19 distribution

Similar results were observed with the aromatase enzyme. We also detected immunoreactivity mainly in the nucleus of glandular epithelial cells. This marker was higher in the control group (**Fig. 3 A-B**), and significantly decreases in CTZ group (**Fig. 3 C-D**). These results were confirmed by histomorphometric analysis (**Fig. 3 E**).

Discussion

Endometriosis is a global public health problem that affects an estimated 176 million women of reproductive age worldwide (26- World Bank 2010). In this way, studies with endometriosis experimental models of autologous transplantation has been used extensively used for evaluated new therapies in this disease treatment (23- Machado et al, 2010; 24- Machado et al, 2016; 20- Machado et al, 2018; 25- Mattos et al, 2019; 27- Grümmer, 2006). However, few studies tested antifungals in endometriosis treatment (20- Machado et al, 2018; 28- Lu et al, 2010; 29- Jouhari et al 2018) and, among them, our work was the only one performed by oral route (20- Machado et al, 2018). Oral administration is the safest and most convenient way to administer medications. In addition, the oral formulations currently available on the market are safe, easy to administer and reach desired therapeutic concentrations, making the oral route an ideal choice (30- Kuper 2008).

Azole antifungal agents act by blocking the sterol enzyme 14α -desmethylase (CYP51), responsible for ergosterol biosynthesis in the fungal cell (31- Vanden Bossche et al, 1989). Clotrimazole (CTZ) is the most commonly used antimycotic drug in gynecology, it has been used for many years in clinical practice, is well tolerated, has minimal side effects and a broad spectrum (32- Zhou et al, 2016). Jouhari et al (2018) evaluated letrozole (0.18 mg/kg/day), an antifungal triazole derivative, for 3 weeks in an autologous transplantation endometriosis model and showed that letrozole treatment decreased size and histopathologic grade of the endometrial lesions *in vivo* (29- Jouhari et al 2018). Similar results were demonstrated by Lu et al (2010) using the antifungal histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, that observed a regression of endometriosis lesions after four weeks of treatment in mice (28- Lu et al 2010). These findings corroborate with our previous (20- Machado et al, 2018) and these actual study in which

CTZ decreased the size and progression of endometriosis lesions after 15 days of treatment when compared to the control animals.

Endometriosis is an estrogen-dependent disease and with the increased in circulating estrogen has been related higher expression of ER α in patients with endometriotic lesions, leading to the progression disease (8- Huhtinen et al, 2012; 33- Delvoux et al, 2008; 34- Andersen et al, 2018). Although the local estrogen levels are higher than the level of circulating estrogen in endometriosis, both mechanism can promote the growth of endometriotic lesions estrogen-dependent (8- Huhtinen et al, 2012a; 35- Huhtinen et al, 2012b). In this way, Naqvi et al (2014) in an endometriosis murine model evaluated the effect of bazedoxifene (BZA), a selective estrogen receptor modulator, with conjugated estrogens (CE) and showed that the BZA treatment leading a significant reduction of the estrogen receptor when compared to control group (11- Naqvi et al, 2014). Azoles family drugs has been demonstrated to decrease estrogen production (21- Trösken et al, 2004). Thus, we investigated the action mechanism of CTZ on estrogen levels and its receptor E α in endometriosis experimental model and we observed a reduction in both estrogen levels and immunostaining.

Furthermore, another important pathway of estrogen is aromatase, enzyme responsible for the last step of estrogen biosynthesis, has been described more abundant in endometriotic lesions, leading to an increased local estrogen concentration and disease progression (12- Mori et al, 2018). Trösken et al (2004) study performed with recombinant aromatase was used to compare the inhibitory potency of twenty-two azole compounds (21- Trösken et al, 2004). Among these compounds, the CTZ was one of the most potent antifungal agents tested *in vitro*, and indicating that these azoles are potent aromatase inhibitors (21- Trösken et al, 2004), corroborating with our findings. CTZ treatment also inhibits aromatase in endometriosis *in vivo*, inducing a decreased in

estrogen production. Aromatase inhibitors are useful for treating estrogen-dependent conditions as endometriosis. However, the current aromatase inhibitors used have many side effects as headache, stiffness or joint pain, nausea and diarrhea (36- Pavone et al, 2012; 37- Polyzos et al, 2011; 38- Barra et al, 2018). Thus, new drug therapies should be investigated to effectively treat endometriosis and with fewer adverse effects.

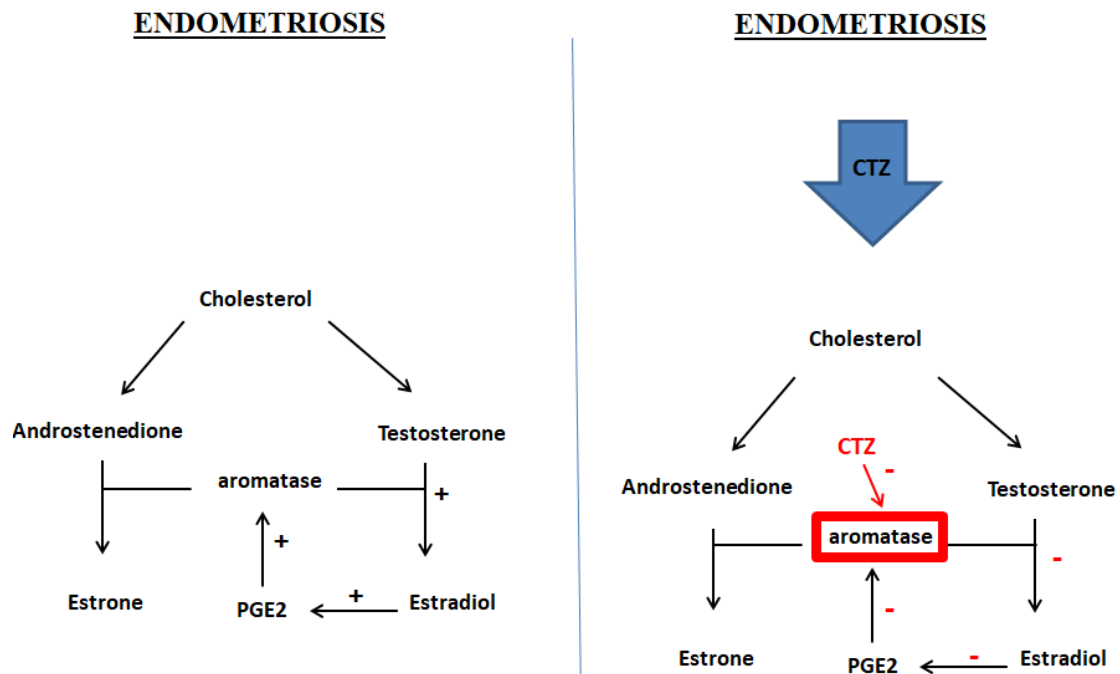


Fig 4. Supposed mechanism of action of CTZ in the estrogen pathway. In endometriosis, there is an increase in both circulating estrogen and in endometriotic lesions. This increase occurs due to increased expression of the aromatase enzyme which may occur by increasing the concentration of PGE₂. CTZ decreases the concentrations of PGE₂, which consequently decreases the expression of aromatase and estrogen production, resulting in disease regression.

Finally, we propose that the action mechanism of CTZ in the decrease endometriotic lesion involves directly the estrogen pathway (Fig 4). In endometriosis, there is an increase in circulating estrogen, and this occurs due to increased expression

of the aromatase enzyme. Interestingly, with the increase of estrogen in endometriosis, there is also an increase in PGE₂ concentrations (22- Bulun et al, 2001), an important inflammatory mediator in endometriosis development (20 Machado et al, 2018). In this cycle, CTZ downregulating the aromatase expression, which consequently decreases the estrogen production and the PGE₂ activity, resulting in disease regression.

Conclusions

In conclusion, the action of CTZ on the regression of endometriosis lesions was effective. The results showed its action in reducing the levels of local and systemic estrogen, hormone responsible for the progression of the disease, specifically in the downregulating of the enzyme aromatase. We believe that in the future it will be possible to carry out clinical tests based on these results, promoting a new strategy to the treatment of endometriosis.

Legends

Fig 1. CTZ decrease endometriosis lesions growth. Endometriotic lesions control (A-B and E-F) and treated with CTZ (C-D and G-H) by intraperitoneal and oral revealed with hematoxylin and eosin coloration (I-L). Control endometriosis showed the presence of endometrial glands (arrows) and stromal cells (*). In the treated animals, the maintenance of the lesions was suppressed and an important atrophy of glands was observed (arrowhead). Magnification X200.

Fig 2. CTZ suppresses estrogen in endometriosis. Immunohistochemical marking for ER α in endometriosis lesions (A-D). There was greater labeling for ER α in the control group (A and B) detected predominantly in the stroma (*), primarily around the glands. CTZ treated endometriotic lesions (C and D) exhibited a significant decrease in reaction

intensity (\rightarrow), being confirmed by morphometric analysis (E). The concentration of serum estrogen dosed by the ELISA method in the control group was also higher when compared to the treated group (F). ($P < 0.05$, Student's t-test).

Fig 3. Aromatase enzyme is reduced with CTZ treatment in endometriosis in vivo.

Immunohistochemical marking for CYP19 (arom) in endometriotic lesions (A-D). There was greater labeling for CYP19 in the control group (*) (A and B), than in the group treated with CTZ (\rightarrow) (C and D), being confirmed by morphometric analysis (E). ($P < 0.05$, Student's t-test).

Fig 4. Supposed mechanism of action of CTZ in the estrogen pathway.

In endometriosis, there is an increase in both circulating estrogen and in endometriotic lesions. This increase occurs due to increased expression of the aromatase enzyme which may occur by increasing the concentration of PGE₂. CTZ decreases the concentrations of PGE₂, which consequently decreases the expression of aromatase and estrogen production, resulting in disease regression.

References:

- 1- Giudice LC. Endometriosis. *New Engl. J. Med. Clin.* 2010;362:2389-98.
- 2- Buck Louis GM, et al. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertil Steril.* 2011;96(2):360-5.
- 3- Acién P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *SRN Obstetric Gynecol.* 2013;2013:242149.
- 4- Fauconnier A, et al. Comparison of patient- and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. *Human Reproduction.*

2013;28(10):2686-94.

5- Parazzini F, Esposito G, Tozzi L, Noli S, Bianchi S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;209:3-7.

6- Vigano P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best practice & research. Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:177-200.

7- Hemmert R, et al. Modifiable life style factors and risk for incident endometriosis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2018. doi: 10.1111/ppe.12516. [Epub ahead of print].

8- Huhtinen K, Desai R, Ståhle M, Salminen A, Handelsman DJ, Perheentupa A, Poutanen M. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):4228-35. doi: 10.1210/jc.2012-1154. Epub 2012 Sep 11.

9- Vercellini P, Buggio L, Berlanda N, Barbara G, Somigliana E, Bosari S. Estrogen-progestins and progestins for the management of endometriosis. *Fertility and Sterility.* 2016;106:1552-71.e2. doi: org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.022.

10- Marie-Scemama L, Even M, De La Joliniere JB, Ayoubi JM. Endometriosis and the menopause: why the question merits our full attention. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2019.

11- Naqvi H, et al. Treatment with Bazedoxifene and Conjugated Estrogens Results in Regression of Endometriosis in a Murine Model. *Biol reprod.* 2014;90(6):121,1-7.

12- Mori T, et al. Aromatase as a target for treating endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2018. doi:10.1111/jog.13743.

13- Lindsay SF, Luciano DE, Luciano AA. Emerging therapy for endometriosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs.* 2015;8214:1-13. doi: 10.1517/14728214.2015.1051966.

14- Vercellini P, et al. Endometriosis: Current Therapies and New Pharmacological Developments. *Drugs.* 2009;69(6):649-75. doi: [10.2165/00003495-200969060-00002](https://doi.org/10.2165/00003495-200969060-00002).

- 15- Becker CM, et al. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. *Fertility and Sterility*. 2017;108(1):125-36.
- 16- Piccinato CA, et al. SULFATION PATHWAYS Contribution of intracrine oestrogens to the aetiology of endometriosis. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(2):T253–T270. doi: 10.1530/JME-17-0297.
- 17- Bedaiwy M. et al. Medical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain. *Semin Reprod Med*. 2017;35(1):38-53. doi: 10.1055/s-0036-1597308.
- 18- Kho RM, Abrão MS. Ovarian remnant syndrome: etiology, diagnosis, treatment and impact of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2012;24(4):210-4.
- 19- Crowley PD, Gallagher HC. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J App Microbiol*. 2014;117(3):611-7. doi: 10.1111/jam.12554.
- 20- Machado DE, et al. Clotrimazole is effective for the regression of endometriotic implants in Wistar rat experimental model of endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;476:17-26. doi: 10.1016/j.mce.2018.04.005.
- 21- Trösken ER, et al. Comparative Assessment of the Inhibition of Recombinant Human CYP19 (Aromatase) by Azoles Used in Agriculture and as Drugs for Humans. *Endocr Res*. 2004;30(3):387-94.
- 22- Bulun SE, et al. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;79(1-5):19-25.
- 23- Machado DE, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. 2010;93(8):2674-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.11.037.
- 24- Machado DE, et al. Euterpe oleracea extract (açai) is a promising novel pharmacological therapeutic treatment for experimental endometriosis. *Plos One*. 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0166059.

25- Mattos RM, et al. Galectin-3 plays an important role in endometriosis development and in a target to endometriosis treatment. *Mol Cell Endocrinol*. 2019 doi: 10.1016/j.mce.2019.02.007.

Discussão:

26- World Bank. Population Projection Tables by Country and Group. 2010. Available at: <http://go.worldbank.org/KZHE1CQFA0>.

27- Grümmer, R. (2006). Animal models in endometriosis research. *Human Reproduction Update*, 12(5), 641–649. doi:10.1093/humupd/dml026.

28- Lu Y, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. *Human Reproduction*. 2010;25(4):1014-25. doi:10.1093/humrep/dep472.

29- Jouhari S, et al. Effects of silymarin, cabergoline and letrozole on rat model of endometriosis. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 57 (2018) 830e835.

30- Kuper KM. Text Book of Competence Assessment Tools for Health-System Pharmacies. 4th ed. ASHP: 2008. Intravenous to oral therapy conversion; pp. 347–60.

31- Vanden Bossche H, et al. Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. *Mycoses*. 1989;32(Suppl 1):35-52.

32- Zhou X, et al. The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. 2016;59:419-28. doi: 10.1111/myc.12485.

33- Delvoux B, et al. Increased Production of 17-Estradiol in Endometriosis Lesions is The Result of Impaired Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008. doi: 10.1210/jc.2008-2218.

34- Andersen CL, et al. The Evolution of Estrogen Receptor Signaling in the Progression of Endometriosis to Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. *Hormones and Cancer*.

2018. doi: 10.1007/s12672-018-0350-9.

35- Huhtinen K, Ståhle M, Perheentupa A, Poutanen M. 2012. Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 358:146–154.

36- Pavone ME, Bulun SE. Aromatase inhibitors for the treatment of endometriosis: a review. *Fertil Steril*. 2012;8(6):1370-9.

37- Polyzos NP, et al. Aromatase inhibitors in post-menopausal endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:90.

38- Barra F, Scala C, Mais V, Guerriero S, Ferrero S. Investigational drugs for the treatment of endometriosis, an update on recent developments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 May;27(5):445-458. doi: 10.1080/13543784.2018.1471135.

7 DISCUSSÃO

Em função das dificuldades para diagnosticar e tratar de forma efetiva a endometriose, além da alta taxa de prevalência e incidência, a doença se torna um problema de saúde pública. Nosso grupo vem trabalhando exaustivamente para encontrar opções farmacológicas que erradiquem de forma definitiva as lesões endometrióticas (MACHADO et al., 2010a; MACHADO et al., 2010b; MACHADO et al., 2014; MACHADO et al., 2015; MACHADO et al., 2016; MACHADO et al., 2018;

ALESSANDRA – PERINI et al., 2018; MATTOS et al., 2019), não só promovendo alívio dos sintomas, mas que trate de forma efetiva a doença. A endometriose pode gerar transtornos físicos, mentais e sociais na vida da mulher, devido aos sintomas que a doença apresenta, principalmente a infertilidade (NNOAHAM et al., 2011).

Nesse contexto, testamos o CTZ em modelo experimental de endometriose peritoneal, já que possui efeitos anti-inflamatórias (THAPA et al., 2008), antiangiogênicas (TAKEI et al., 2003), inibe a enzima aromatase (TRÖSKEN et al., 2004), envolvida na produção do estrogênio (BEIJER et al., 2018), além de ser um medicamento já comercializado para uma doença ginecológica (RUSSO et al., 2019), como baixo custo (FURTADO et al., 2012) e efeitos adversos aceitáveis (BRUGNARA et al., 1996).

O CTZ é utilizado na prática clínica atual para tratamento de *Candida albicans* e outras infecções causadas por fungos (CROWLEY; GALLAGHER, 2014). Outros estudos também investigaram antifúngicos na endometriose. Lu et al (2010) utilizaram a tricostatina A em camundongos com endometriose induzida. Foi observado regressão das lesões de endometriose após quatro semanas de tratamento com o antifúngico administrado na dose de 0,5 mg/kg diluídos em 40 µl de DMSO, por injeções subcutâneas, quando comparados ao grupo controle (LU et al., 2010).

Recentemente, Jouhari et al (2018) também testaram antifúngicos no tratamento da endometriose. Após três semanas, o grupo avaliou os efeitos de letrozol (0,18mg/kg/dia), um derivado triazólico antifúngico, em modelo de endometriose por transplante autólogo e observaram que o tratamento com letrozol causou atrofia e regressão das lesões endometriais *in vivo*. Esses achados corroboram com nosso estudo, no qual o CTZ diminuiu o tamanho das lesões e as análises histológicas confirmaram a regressão e atrofia das lesões nos animais tratados quando comparados aos animais controles. Contudo, em nosso estudo avaliamos o CTZ por via oral, forma ideal para o tratamento da endometriose, e observamos que o CTZ foi efetivo no tratamento sem causar toxicidade.

O desenvolvimento e a manutenção das lesões endometrióticas envolvem vários processos, sendo a angiogênese de vital importância (BARAÑAO, 2014). A angiogênese depende da expressão de muitos fatores estimulantes, nos quais o principal fator que regula a proliferação e migração de células endoteliais é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e seus receptores (TAKEI et al., 2003). Estudos demonstraram que o fluido peritoneal de pacientes com endometriose em comparação

com o de mulheres saudáveis, contém quantidades significativamente maiores de VEGF, produzido por macrófagos presentes no líquido peritoneal por estímulo dos hormônios ovarianos (MCLAREN, 1996). A angiogênese induzida por VEGF é um fator limitante na fisiopatologia da endometriose e sua intervenção pode prevenir ou até inibir o desenvolvimento da doença (MACHADO et al., 2008). Portanto, agentes antiangiogênicos são estudados como possíveis alternativas para novas abordagens terapêuticas da endometriose (BECKER et al., 2017).

Estudos anteriores já demonstraram que o CTZ bloqueia o VEGF em modelos de câncer, apresentando efeito antiangiogênico no crescimento tumoral (TAKAHASHI et al., 1998; TAKEI et al., 2003). Em nosso trabalho, a expressão de VEGF e seu receptor VEGFR-2 foi diminuída nos animais do grupo CTZ quando comparados aos animais do grupo controle. Como já mencionado, a sinalização de VEGF/VEGFR-2 aumenta a migração e a proliferação de células endoteliais (FERRARA, 2000), sendo uma condição essencial para a manutenção e crescimento das lesões de endometriose (MACHADO et al., 2008).

A angiogênese também pode ser regulada positivamente a partir do aumento dos níveis locais de citocinas pró-inflamatórias, e a consequente regulação positiva de PGE2 (MACHADO et al., 2010; SACCO et al., 2012; KIM et al., 2013; SZADE et al., 2015). Nesse contexto, os macrófagos ganham relevância, pois são células envolvidas na angiogênese e na inflamação (WU et al., 2002). Observamos uma redução de macrófagos no lavado peritoneal dos animais tratados, reiterando o papel anti-inflamatório do CTZ nas lesões. Por conseguinte, também mostramos uma redução dos níveis de PGE2 após tratamento com CTZ. Sacco et al (2012) mostram que na endometriose, PGE2 e estrogênio aumentam a expressão do VEGF, promovendo assim, a angiogênese (SACCO et al., 2012).

Um outro mediador inflamatório importante é o TNF- α , que também está aumentado nas lesões endometrióticas, devido ao aumento da infiltração de macrófagos que secretam esse fator (KURT et al., 2015). Wu et al (2003) mostraram em um estudo de revisão que diversas citocinas, como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10), TNF α e VEGF estão aumentados no líquido peritoneal de mulheres com endometriose, e essas citocinas podem estar envolvidas na ativação de macrófagos, inflamação e angiogênese (WU; HO, 2003). Dessa forma, a diminuição de macrófagos promovida pelo CTZ pode ser responsável pela diminuição dos níveis de PGE2 e TNF- α em nosso estudo.

O crescimento das lesões de endometriose também está relacionado, em grande

parte, à ação do estrogênio. Por outro lado, sua redução pode ser causada pela supressão farmacológica, o que reduz a progressão da doença (NAQVI et al., 2014; MARIE-SCEMAMA et al., 2019). Atualmente, o tratamento clínico de primeira linha para a endometriose está relacionado à supressão hormonal, mas este tipo de tratamento possui muitos efeitos adversos, dentre eles ganho de peso, câibras musculares, acne, seborreia, depressão, rubor, atrofia urogenital, perda de libido e diminuição da massa óssea (VERCELLINI et al., 2009; BECKER et al., 2017). Além disso, para aquelas pacientes que desejam engravidar, o tratamento com supressão hormonal torna-se um impedimento (BEDAIWY et al., 2016). Com intuito de investigar ainda mais o mecanismo de ação e a eficácia do CTZ na redução das lesões, avaliamos se existe alguma relação deste fármaco com o estrogênio e observamos uma menor marcação de ER α nos animais do grupo tratado quando comparados aos animais do grupo controle.

Naqvi et al (2014) testaram bazedoxifeno (BZA), nova geração de modulador seletivo de receptor de estrogênio, em combinação com estrogênios conjugados (CE) para criar um complexo de estrogênio específico do tecido (TSEC). Ao contrário BZA sozinho, este complexo fornece alívio dos sintomas vasomotores em mulheres na menopausa. O estudo avaliou o efeito de TSEC (BZA/CE) em lesões endometriais ectópicas em modelo de endometriose em ratos. Para isso, administraram nos animais com função ovariana intacta, doses de BZA com ou sem CE (3mg/kg/dia). Os efeitos de TSEC no endométrio foram positivos na redução das lesões e da expressão do receptor de estrogênio, sugerindo que este complexo pode ser um agente efetivo no tratamento da endometriose (NAQVI et al., 2014). Em nosso estudo, foi observada a redução dos receptores de estrogênio nos animais tratados com CTZ, além da redução dos níveis de estrogênio sérico nesses animais. Embora o nível de estrogênio local seja maior que o nível de estrogênio circulante na endometriose, ambos podem promover o crescimento de lesões e progressão da doença (HUHTINEN, 2012; HUHTINEN, 2012b). Assim, também observamos que o tratamento com CTZ reduziu significativamente os níveis séricos de estrogênio nos animais em comparação com os controles.

Visto que o CTZ reduziu os níveis de estrogênio na endometriose, surge a necessidade de se investigar a farmacodinâmica do CTZ na endometriose. A aromatase é a enzima chave para a biossíntese de estrogênio, converte a testosterona e a androstenediona em estradiol (E2) e estrona (E1), respectivamente (BULUN et al., 2001). Na endometriose, a aromatase pode ser estimulada pela PGE2 estabelecendo um ciclo de feedback positivo (BULUN et al., 2001). No presente estudo, foi observado que

o CTZ também inibe a enzima aromatase *in vivo*, conseqüentemente diminuindo a produção de estrogênio.

Dessa forma, sugerimos o mecanismo de ação do CTZ na diminuição da lesão endometriótica, envolvendo diretamente a via do estrogênio. Na endometriose, há um aumento no estrogênio circulante, e isso ocorre devido ao aumento da expressão da enzima aromatase. Com esse aumento do estrogênio na endometriose, aumenta-se também as concentrações de PGE2. Neste ciclo, o CTZ diminui a expressão da aromatase, o que conseqüentemente diminui a produção de estrogênio e a atividade da PGE2, resultando em regressão da doença.

As diferentes formas de administração do CTZ (creme, solução, pastilha e comprimido intra-vaginal), permitem que o princípio ativo alcance concentrações plasmáticas ideais, sem promover efeitos adversos (GOODMAN, 2003; ANVISA, 2015). No presente estudo, o CTZ foi administrado nos animais por via oral e IP, em seguida, foram realizadas as análises do peso corporal do animal, peso do fígado, função hepática e metabólica, além da análise hematológica. De acordo com essas análises, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado com CTZ, indicando ausência de toxicidade.

Finalmente, os resultados do presente estudo sugerem que o CTZ pode ser utilizado em novos testes pré-clínicos e futuramente clínicos para o tratamento da endometriose, já que ele pode levar a alterações importantes nas vias angiogênica, inflamatória e de produção do estrogênio, vias cruciais no desenvolvimento da doença. É de suma importância a busca de novas terapias para o tratamento da endometriose, não apenas para alívio dos sintomas, mas também para cura da doença.

8 CONCLUSÃO

- O CTZ foi efetivo na regressão das lesões endometrióticas (Peso da lesão controle : 0,61g e CTZ: 0,27g/ Área da lesão controle: 141,16% e CTZ: 38,67), confirmado pela análise histológica com atrofia das lesões;
- O CTZ apresentou atividade antiangiogênica, devido a redução de macrófagos ativos no local da lesão, com diminuição da expressão do VEGF e seu receptor VEGFR-2 nas lesões endometrióticas;
- O CTZ apresentou ação anti-inflamatória na endometriose, devido a redução dos níveis séricos de PGE2 e IL-10;

- O CTZ reduziu os níveis de estrogênio local e sistêmico pela regulação negativa da enzima aromatase.

Finalmente, o CTZ apresentou efeitos farmacológicos positivos na regressão da endometriose peritoneal experimental, sem causar toxicidade, tornando-se um fármaco relevante para o tratamento clínico da doença.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. S. **Endometriose: uma visão contemporânea**. RIO DE JANEIRO, RJ: REVINTER, 2000.

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Bula aprovada pela Anvisa em (03/abr/2015).

ALESSANDRA – PERINI, J. et al. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of Euterpe oleracea extract (açai): A systematic review **PLoS One**, v.13, jul. 2018.

ALMEIDA FILHO, D. P. DE; OLIVEIRA, L. J. DE; AMARAL, V. F. DO. Accuracy of laparoscopy for assessing patients with endometriosis. **Sao Paulo Medical Journal**,v. 126, n. 6, p. 305–308, nov. 2008.

ASRM. **American Society For Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification Of Endometriosis**, 1997.

- AYUB, M.; LEVELL, M.J. The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. **Biochem Pharmacol**, v. 40, p. 75-1569, out. 1990.
- BALLARD, K.; LOWTON, K.; WRIGHT, J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 5, p. 1296-1301, nov. 2006.
- BARAÑAO, I.R. [Endometriosis. Why is not removed by the immune system?]. **Ginecol Obstet**, v. 82, p. 63-755, nov. 2014
- BARBOSA, J. S. et al. Clinical and endocrine features of Brazilian infertile women with or without endometriosis: A comparative cross-sectional study. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 4, p. 275-281, dez. 2014.
- BARRA, F. et al. Investigational drugs for the treatment of endometriosis, an update on recent developments. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 5, p. 445-458, mai. 2018.
- BECKER, C. M. et al. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 1, p. 125-136, jul. 2017.
- BEDAIWY, M. et al. Medical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 35, n. 01, p. 038-053, 21 dez. 2016.
- BEDAIWY, M.A. et al. Medical management of endometriosis in patients with chronic pelvic pain. **Semin. Reprod. Med.**, v. 35, p. 38-53, jan.2017.
- BEIJER, K. et al. Azoles additively inhibit cytochrome P450 1 (EROD) and 19 (aromatase) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat Toxicol.**, v. 198, p. 73-81, mai.2018.
- BELLELIS, P. et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis—a case series. **Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 56, n. 4, p. 467-471, ago. 2010.
- BENDON, C. L.; BECKER, C. M. Potential mechanisms of postmenopausal endometriosis. **Maturitas**, v. 72, n. 3, p. 214-219, jul. 2012.
- BOURGIOTI, C. et al. MR imaging of endometriosis: Spectrum of disease. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 98, n. 11, p. 751-767, nov. 2017.
- BRADFORD, L. S.; BORUTA, D. M. Laparoendoscopic Single-Site Surgery in Gynecology: A Review of the Literature, Tools, and Techniques. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 68, n. 4, p. 295-304, abr. 2013.
- BRITTON, J.A. et al. Diet and benign ovarian tumors (United States). **Cancer Causes Control**, v.11, p. 38-401, mar. 2000.
- BRUGNARA, C. et al. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. **J Clin Invest**, v. 97, p. 34-1227, mar. 1996.
- BULLETTI, C. et al. Endometriosis and infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 8, p. 441-447, ago. 2010.

BULUN, S. E. et al. Estrogen production and metabolism in endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 75- 85; discussion 86-88, 396–406, mar. 2002.

BULUN, S.E. et al. Role of aromatase in endometrial disease. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 79, p. 19-25, 2001.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 3, p. 511–519, set. 2012.

CARDOSO, J. V. et al. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 16, n. 3, p. 219–232, set. 2016.

CEA SORIANO, L. et al. Incidence, treatment and recurrence of endometriosis in a UK-based population analysis using data from The Health Improvement Network and the Hospital Episode Statistics database. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, v. 22, n. 5, p. 334–343, 3 set. 2017.

CHAPRON, C. et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. **Human Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 702–711, 1 mar. 2012.

CHENG, Y.-M.; WANG, S.-T.; CHOU, C.-Y. Serum CA-125 in preoperative patients at high risk for endometriosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 99, n. 3, p. 375–380, mar. 2002.

CHRISTODOULAKOS, G. et al. Pathogenesis of endometriosis: The role of defective “immunosurveillance”. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, v. 12, n. 3, p. 194–202, jan. 2007.

CHUNG, B. Y. et al. The antimycotic agent clotrimazole inhibits melanogenesis by accelerating ERK and PI3K-/Akt-mediated tyrosinase degradation. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 5, p. 386–388, maio 2015.

CRAMER, D. W.; MISSMER, S. A. The epidemiology of endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 955, p. 11- 22; discussion 34-36, 396–406, mar. 2002.

CROWLEY, P. D. et al. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. **J App Microbiol**, v. 117, p. 7-611, 2014.

CUDMORE, S. L. et al. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 783–793, 1 out. 2004.

DANIILIDIS, A.; PADOS, G. Comments on the ESHRE recommendations for the treatment of minimal endometriosis in infertile women. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 36, n. 1, p. 84–87, jan. 2018.

DONNEZ, J. et al. Typical and subtle atypical presentations of endometriosis. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 83–93, viii, mar. 2003.

DUNSELMAN, G. A. J. et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 29, n. 3, p. 400–412, 1 mar. 2014.

EISENBERG, V. et al. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 125, n. 1, p. 55–62, jan. 2018.

EISENBERG, V. H. et al. Applying a statistical method in transvaginal ultrasound training: lessons from the learning curve cumulative summation test (LC-CUSUM) for endometriosis mapping. **Gynecological Surgery**, v. 14, n. 1, dez. 2017.

ESKENAZI, B.; WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 235–258, jun. 1997.

FALCONE, T.; FLYCKT, R. Clinical Management of Endometriosis: **Obstetrics & Gynecology**, v. 131, n. 3, p. 557–571, mar. 2018.

FASSBENDER, A. et al. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

FAUCONNIER, A. et al. Comparison of patient- and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. **Human Reproduction**, v. 28, n. 10, p. 2686–2694, 1 out. 2013.

FERRARA N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Prog Horm Res**, v.55, p. 15-35, 2000.

FERRERO, S. et al. Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 89, 2011.

FIGUEIRA, P. G. M. et al. Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis: Stem cells, the endometrium, and endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 10–17, mar. 2011.

FURTADO, C. M. et al. Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30462, 8 fev. 2012.

GIUDICE, L. C. Endometriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 25, p. 2389–2398, 24 jun. 2010.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **The Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789–1799, nov. 2004.

GOODMAN, L. S. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GOUGOUTAS, C. A. et al. Pelvic endo-metriosi: various manifestations and MR imaging findings. **Fertility & Sterility**, v. 79, p. 85- 1078, ago. 2000.

GRUENWALD, P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 44, n. 3, p. 470–474, set. 1942.

GYLLENHAMMAR, I. et al.

Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat Toxicol*, v. 91, p. 9-102, jan. 2009.

HIRSCH M. et al. Diagnostic accuracy of Cancer Antigen 125 (CA125) **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 1 maio 2016.

HOYOS, L. R.; JOHNSON, S.; PUSCHECK, E. Endometriosis and Imaging: **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 60, n. 3, p. 503–516, set. 2017.

HUANG, F. et al. Effect of GnRH-II on the ESC proliferation, apoptosis and VEGF secretion in patients with endometriosis in vitro. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 11, p. 2487–2496, 2013.

HUDELIST, G. et al. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. **Human Reproduction**, v. 27, n. 12, p. 3412–3416, 1 dez. 2012.

HUHTINEN, K. et al. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 97, p. 35-4228, set. 2012.

HUHTINEN, K. et al.. Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 358, p. 146-154, 2012.b

IKEDA, F. et al. Microlaparoscopy vs. conventional laparoscopy for the management of early-stage pelvic endometriosis: a comparison. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 50, n. 10, p. 771–778, out. 2005.

JOUHARI, S. et al. Effects of silymarin, cabergoline and letrozole on rat model of endometriosis. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 57, p. 830-835, 2018.

JUNG, Y. W.; KIM, S. W.; KIM, Y. T. Recent advances of robotic surgery and single port laparoscopy in gynecologic oncology. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 20, n. 3, p. 137, 2009.

KARIMI-ZARCHI, M. et al. Correlation of CA-125 serum level and clinico-pathological characteristic of patients with endometriosis. **Int J Reprod Biomed (Yazd)**, v. 11, p. 713-718, nov. 2016.

KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Human Reproduction**, v. 20, n. 10, p. 2698–2704, 1 out. 2005.

KONINCKX, P. R.; KENNEDY, S. H.; BARLOW, D. H. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 5, p. 741–751, out. 1998.

KÖSTER, I. et al. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany—the CoDiM Study. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1498–1504, jul. 2006.

KURT, R.K. et al. Protective effects of colchicine in an experimental rat endometriosis model: histopathological evaluation and assessment of TNF-alpha levels. **Reprod. Sci**, v. 22, p. 258-263, 2015.

KUZNETSOZ, L. et al. Diagnosis and management of endometriosis: summary of NICE guidance. **BMJ**, v. 358, p. 3935, set. 2017.

KYAMA, C. M. et al. Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 1, p. 444–454, 1 jun. 2009.

LAGANÀ, A. S. et al. Clinical dynamics of Dienogest for the treatment of endometriosis: from bench to bedside. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 593–596, 3 jun. 2017.

LASCHKE, M. W.; GIEBELS, C.; MENGER, M. D. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 5, p. 628–636, 1 set. 2011.

LEARDINI, G. et al. A multicenter cost-of-illness study on rheumatoid arthritis in Italy. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 505–515, ago. 2002.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Structural basis for conservation in the CYP51 family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 1, p. 88–93, jan. 2011.

LIU, S. et al. Efficacy of Anti-VEGF/VEGFR Agents on Animal Models of Endometriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166658, 17 nov. 2016.

LU, Y. et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. **Human Reproduction**, v. 25, p. 25-1014, jan. 2010.

MABROUK, M. et al. Pelvic floor muscle assessment at 3-and 4-dimensional transperineal ultrasound in women with endometriosis, with or without retroperitoneal infiltration: a step towards complete functional assessment: perineum and DIE. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, 11 out. 2017.

MACHADO D.E. et al. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 148-155, 2008.

MACHADO, D. E. et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 8, p. 2674–2679, maio 2010b.

MACHADO, D. E. et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 29, p. 4, 19 jan. 2010a.

MACHADO, D.E. et al. A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. **Histol Histopathol**, v.29, p. 12-903, jan.2014.

MACHADO, D.E. et al. Clotrimazole is effective for the regression of endometriotic implants in Wistar rat experimental model of endometriosis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 476, p. 17-26, nov. 2018.

MACHADO, D.E. et al. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. **Biomed Res Int**, jul. 2015.

MACHADO, D.E. et al. Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. **PLoS One.**, v. 11, nov. 2016.

MARIE-SCEMAMA, L. et al. Endometriosis and the menopause: why the question merits our full attention. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 37, mar. 2019.

MARINHO, M. C. P. et al. Quality of Life in Women with Endometriosis: An Integrative Review. **Journal of Women's Health**, 24 out. 2017.

MÁRKI, G. et al. Physical pain and emotion regulation as the main predictive factors of health-related quality of life in women living with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 32, n. 7, p. 1432–1438, jul. 2017.

MAST, N. et al. Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1. **Molecular Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 86–94, 1 jul. 2013.

MATTOS, R.M. et al. Galectin-3 plays an important role in endometriosis development and is a target to endometriosis treatment. **Mol Cell Endocrinol**. v. 486, p. 1-10, abr.2019.

MCLAREN, J. et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 2, p. 482–489, 15 jul. 1996.

MCLEOD, B. S.; RETZLOFF, M. G. Epidemiology of Endometriosis:: An Assessment of Risk Factors. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 2, p. 389–396, jun. 2010.

METTLER, L.; RUPRAI, R.; ALKATOUT, I. Impact of Medical and Surgical Treatment of Endometriosis on the Cure of Endometriosis and Pain. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

MIHALYI, A. et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. **Human Reproduction**, v. 25, n. 3, p. 654–664, 1 mar. 2010.

MORASSUTTO, C. et al. Incidence and Estimated Prevalence of Endometriosis and Adenomyosis in Northeast Italy: A Data Linkage Study. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154227, 21 abr. 2016.

MORI, T. et al. Aromatase as a target for treating endometriosis. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 44, p. 1673-1681, set. 2018.

NAQVI H. et al. Treatment with Bazedoxifene and Conjugated Estrogens Results in Regression of Endometriosis in a Murine Model. **Biol reprod**, v. 90, p. 1-7, 2014.

NISENBLAT, V. et al. Blood biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 1 maio 2016.

NNOAHAM, K. E. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 2, p. 366–373.e8, ago. 2011.

OLADOSU, F. A.; TU, F. F.; HELLMAN, K. M. Nonsteroidal antiinflammatory drug resistance in dysmenorrhea: epidemiology, causes, and treatment. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, set. 2017.

OLIVE, D. L.; SCHWARTZ, L. B. Endometriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 24, p. 1759–1769, 17 jun. 1993.

OLIVEIRA, M. A. P. et al. How to Use CA-125 More Effectively in the Diagnosis of Deep Endometriosis. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

OZYUREK, E. S.; YOLDEMIR, T.; KALKAN, U. Surgical challenges in the treatment of perimenopausal and postmenopausal endometriosis. **Climacteric**, p. 1–6, mar. 2018.

PARAZZINI, F. et al. Determinants of short term recurrence rate of endometriosis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 121, n. 2, p. 216–219, 1 ago. 2005.

PAVONE, M. E.; BULUN, S. E. Aromatase inhibitors for the treatment of endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 6, p. 1370–1379, dez. 2012.

PENG YU, A. et al. The costs of Crohn's disease in the United States and other Western countries: a systematic review. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 2, p. 319–328, fev. 2008.

POLYZOS, N. P. et al. Aromatase inhibitors in post-menopausal endometriosis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 90, 2011.

RAY, K. et al. Oxidation-sensitive nociception involved in endometriosis-associated pain: **PAIN**, v. 156, n. 3, p. 528–539, mar. 2015.

ROGERS, P. A. W. et al. Priorities for Endometriosis Research: Recommendations From an International Consensus Workshop. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 4, p. 335–346, abr. 2009.

1. RUSSO, R. et al. Randomised clinical trial in women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Efficacy of probiotics and lactoferrin as maintenance treatment. **Mycoses**, v. 62, p. 322–335, abr. 2019.

SAAVALAINEN, L. et al. Trends in the incidence rate, type and treatment of surgically verified endometriosis - a nationwide cohort study. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 97, n. 1, p. 59–67, jan. 2018.

SACCO, K. et al. The role of prostaglandin E2 in endometriosis. **Gynecol.Endocrinol**, v. 28, p. 134–138, 2012..

SALAMAH, K.; ABUZOID, M.; ABU-ZAID, A. Single-incision laparoscopic surgery in gynecologic surgery: a single-institutional experience from Saudi Arabia. **F1000Research**, v. 6, p. 1657, 7 set. 2017.

SASSON, I. E.; TAYLOR, H. S. *Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, n. 1, p. 106–115, abr. 2008.

SCHINDLER, A. Dienogest in long-term treatment of endometriosis. **International Journal of Women's Health**, p. 175, jul. 2011.

SELCUK, İ.; BOZDAG, G. Recurrence of endometriosis; risk factors, mechanisms and biomarkers; review of the literature. **Journal of the Turkish German Gynecological Association**, v. 14, n. 2, p. 98–103, 10 jun. 2013.

SIKORA, J.; MIELCZAREK-PALACZ, A.; KONDERA-ANASZ, Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 200–208, 2011.

SIMPSON, J. et al. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 137, p. 327–331, jun., 1980.

SINAI, N. et al. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 3, p. 538–545, mar. 2008.

SINAI, N. et al. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 10, p. 2715–2724, out. 2002.

SOLIMAN, A. M. et al. The direct and indirect costs associated with endometriosis: a systematic literature review. **Human Reproduction**, v. 31, n. 4, p. 712–722, abr. 2016.

SOURIAL, S.; TEMPEST, N.; HAPANGAMA, D. K. Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. **International Journal of Reproductive Medicine**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

STRATTON, P. et al. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. **Fertility & Sterility**, v. 79, p. 85–1078, mai. 2003.

STREHL, J. D. et al. Correlation of histological and macroscopic findings in peritoneal endometriosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 1, p. 152–162, 2014.

STREULI, I. et al. Endometriosis after menopause: physiopathology and management of an uncommon condition. **Climacteric**, v. 20, n. 2, p. 138–143, 4 mar. 2017.

SURREY, E. S. Gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back therapy: what do the data show?: **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, p. 1, maio 2010.

SZUBERT, M.; ZIĘTARA, M.; SUZIN, J. Conservative treatment of deep infiltrating endometriosis: review of existing options. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 10–14, 2 jan. 2018.

TAKAHASHI, H. et al. Clotrimazole, an imidazole antimycotic, is a potent inhibitor of angiogenesis. **Japanese Journal of Cancer Research: Gann**, v. 89, n. 4, p. 445–451, abr. 1998.

TAKEI, S. et al. Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats. **Int. J. Urol**, v. 10, p. 78–85, 2003.

TAYLOR, H. S. Clinical diagnosis of endometriosis and optimal medical therapy. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 5, p. 759–760, nov. 2017.

THALLURI, A. L.; KNOX, S.; NGUYEN, T. MRI findings in deep infiltrating endometriosis: A pictorial essay. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 61, n. 6, p. 767–773, dez. 2017.

THAPA, D. et al. Clotrimazole Ameliorates Intestinal Inflammation and Abnormal Angiogenesis by Inhibiting Interleukin-8 Expression through a Nuclear Factor-B-Dependent Manner. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, p. 64–353, ago. 2008.

TOBIUME, T. et al. Determinant factors of postoperative recurrence of endometriosis: difference between endometrioma and pain. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 205, p. 54–59, out. 2016.

TRÖSKEN, E.R. et al. Comparative Assessment of the Inhibition of Recombinant Human CYP19 (Aromatase) by Azoles Used in Agriculture and as Drugs for Humans. **ENDOCRINE RESEARCH**, v. 30, p. 387–394, 2004.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. **Mycoses**, v. 32 Suppl 1, p. 35–52, 1989.

VELEBIL, P. et al. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. **Obstetrics & Gynecology**, v. 86, n. 5, p. 764–769, nov. 1995.

VERCELLINI, P. et al. Endometriosis: Current Therapies and New Pharmacological Developments. **Drugs**, v. 69, n. 6, p. 649–675, 2009.

VERCELLINI, P. et al. Norethindrone acetate or dienogest for the treatment of symptomatic endometriosis: a before and after study. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 3, p. 734–743.e3, mar. 2016.

WALTER, A. J. et al. Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 184, n. 7, p. 1407- 1411; discussion 1411-1413, jun. 2001.

WANG, J. et al. The In Vitro and In Vivo Antitumor Effects of Clotrimazole on Oral Squamous Cell Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98885, 3 jun. 2014.

WENG, H. et al. GnRH agonists induce endometrial epithelial cell apoptosis via GRP78 down-regulation. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, dez. 2014.

WU, M.Y.; HO, H.N. The role of cytokines in endometriosis. **Am. J. Reprod. Immunol**, v. 49, p. 285–296, 2003.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 10, n. 4, p. 655–683, 2011.

ZITO, G. et al. Medical Treatments for Endometriosis-Associated Pelvic Pain. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

ANEXO A

Parecer n° 008

Pesquisador Responsável: Prof. Daniel Escorsim Machado

Tipo de Pesquisa: Pesquisa, Extensão/Treinamento

Instituição onde será desenvolvido: UEZO e UFRJ

Situação: **APROVADO**

Após analisar o projeto de pesquisa "Estabelecimento de modelo experimental de endometriose peritoneal", considero que o projeto se encontra adequado e satisfatório de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO** pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Norma de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Centro Universitário Estadual de Zona Oeste.

Rio de Janeiro, 05 de novembro de 2014



Prof. Michel Alexandre Vilani Gantus

Coordenador de CEUA-UEZO