

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
**Doutorado**

**EFEITOS DA TALIDOMIDA NO TRATAMENTO DA  
ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL EM RATAS**

ISABELA BASTOS JÁCOME DE SOUZA

São Luís  
2023

ISABELA BASTOS JÁCOME DE SOUZA

**EFEITOS DA TALIDOMIDA NO TRATAMENTO DA  
ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL EM RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Profº Dr. João Batista Santos Garcia

Co-orientadora: Profª Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Souza, Isabela Bastos Jácome de

Efeitos da talidomida no tratamento da endometriose experimental em ratas / Isabela Bastos Jácome de Souza. - 2023.  
99 f.

Orientador: João Batista Santos Garcia.

Co-orientadora: Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Endométrio. 2. Roedores. 3. Inflamação. 4. Dor. 5. Analgesia. I. Garcia, João Batista Santos. II. Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa. III. Título.

ISABELA BASTOS JÁCOME DE SOUZA

**EFEITOS DA TALIDOMIDA NO TRATAMENTO DA  
ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL EM RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em:        /        /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia (Orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa (1ª Examinadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. João Nogueira Neto (2º Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio (3ª Examinadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Renata Mondego de Oliveira (4ª Examinadora)  
Universidade Estadual do Maranhão

“Temos que continuar aprendendo.  
Temos que estar abertos. E temos que  
estar prontos para espalhar nosso  
conhecimento a fim de chegar a uma  
compreensão mais elevada da realidade.”

Thich Nhat Hanh

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, Deus Pai Todo Poderoso e Nossa Senhora Aparecida pelo amor infinito e misericordioso. Sinto que cuidam de mim e zelam pela minha segurança e felicidade.

Aos meus três grandiosos tesouros, meus pais Anapolino e Francidalva e minha irmã Suzana pelo amor, companheirismo e união na nossa jornada de vida. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu companheiro de vida, Wellington minha maior motivação diária. Te amo muito esposo! Obrigada por aturar minha ansiedade diária (risos)!

Aos meus primos, tios, sobrinhos e cunhados pela força e torcida diária.

Aos meus amigos Álvaro, Ráysa, Júlio, Lícia, Vitória, Priscila, Moisés Wiliane, Helena, Luciana, Davi, Rosana, Aline e Lucas por TUDO.

Ao meu orientador, professor Dr. João Batista Santos Garcia, a quem tenho profunda admiração e respeito como professor, pesquisador e médico representando uma referência internacional. Obrigada por acreditar no meu potencial acadêmico e profissional. Que sua vida seja plena e que o senhor continue fazendo a diferença na vida dos seus pacientes e alunos.

À minha coorientadora, Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, obrigada por ser essa educadora, pessoa, pesquisadora tão humilde e sublime. Você é única. Sinto-me uma privilegiada em poder ser sua aluna e contar com sua amizade. Gratidão por ter acreditado em mim e pelo incentivo durante todos esses anos. Você foi fundamental (é) na minha vida pessoal e profissional.

A todos os professores que colaboraram direta ou indiretamente para a produção deste estudo, em especial Dra. Mayara Cristina, Dra. Rosane Nassar Guerra, Dr. João Nogueira Neto, Dr. Sebastião e Dr. Rui Miguel da Costa, obrigada pela disposição e prazer em ensinar.

Ao Laboratório Experimental para Estudo da Dor (LEED) / UFMA e seus estimados pesquisadores, por permitirem a utilização de seu espaço e estrutura para o desenvolvimento da ciência.

Aos meus parceiros de pesquisa Rafael de Abreu, Felipe Ribeiro, Gustavo Frota, Priscylla Gouveia, pelo auxílio, ajuda e apoio na construção desta pesquisa. Sem vocês nada seria possível. Vocês se tornaram grandes amigos.

Obrigada aos alunos de iniciação científica Caio Viana, Paloma, Kevin e Alex, que além da habilidade técnica e conhecimento científico demonstraram empenho e compromisso. Desejo sucesso em suas caminhadas. Vocês merecem o mundo!

Aos integrantes da Liga Acadêmica de Dor / UFMA que sempre foram solícitos. Obrigada pela presença e engajamento em nosso estudo. Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-UFMA, por sempre buscar e manter alto grau de excelência ao programa de pós-graduação, através de excelentes professores e funcionários que, com seu trabalho, valorizam a busca do conhecimento científico.

A todos os amigos de turma pela parceria, em especial Irla Correia Lima Licá e Érica Caldas, pela força, incentivo, ajuda e amizade ao longo de todos esses anos de doutorado.

A Faculdade Santa Terezinha (CEST) e minha coordenadora Roseane Lustosa pelo incentivo a qualificação do seu corpo docente. As minhas companheiras de docência Mércia Claro e Tayla Jatahy que sempre me apoiaram nesta jornada.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio financeiro destinado a esta pesquisa.

## RESUMO

A endometriose é uma doença crônica e debilitante associada a dor pélvica. Estratégias tem sido pesquisadas para o controle da dor, como a utilização de substâncias anti-inflamatórias. Nesta perspectiva, a talidomida surge como opção no controle algico por sua propriedade imunomoduladora utilizada no tratamento de diversas condições clínicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório da talidomida no tratamento de endometriose experimental. Foram utilizadas 36 ratas da linhagem Wistar e separadas aleatoriamente em 06 grupos: CONTROLE (-), LEUPROLIDA, SHAM e grupos T25, T50 e T100 com administração via oral respectivamente de 25, 50, e 100mg/kg/dia de talidomida. Foram realizados testes comportamentais para avaliação da dor, avaliação dos níveis séricos das citocinas (INF  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 e IL-10); aferições dos volumes dos implantes antes e ao final do protocolo de tratamento e estudo histopatológico das áreas de implante. A partir da dose de 50mg/kg/dia, observou-se redução do limiar de dor nos testes comportamentais aplicados. Nos grupos T50 e T100 houve manutenção de baixos níveis TNF  $\alpha$  e IL6 além de uma redução da expressão de IL10. Observou-se níveis de IFN- $\gamma$  muito próximos entre os grupos tratados e o grupo SHAM. Os grupos T50, T100 e leuprolida obtiveram a menor preservação do epitélio ectópico indicando redução do implante endometriótico. No modelo estudado, a talidomida teve uma ação analgésica, anti-inflamatória e reduziu o tamanho dos implantes, mais expressiva com doses a partir de 50mg/kg/dia, podendo ser sugerida como uma opção no tratamento da dor da endometriose.

Palavras-chave: endométrio; roedores; inflamação, dor, analgesia.

## ABSTRACT

Endometriosis is a chronic and debilitating disease associated with pelvic pain. Strategies have been researched for pain control, such as the use of anti-inflammatory substances. In this perspective, thalidomide appears as an option in pain control due to its immunomodulatory property used in the treatment of various clinical conditions. The objective of this work was to evaluate the analgesic and anti-inflammatory effect of thalidomide in the treatment of experimental endometriosis. 36 Wistar rats were used and randomly separated into 06 groups: CONTROL (-), LEUPROLIDE, SHAM and groups T25, T50 and T100 with oral administration of 25, 50 and 100 mg/kg/day of thalidomide respectively. Behavioral tests were performed to evaluate pain, evaluate serum levels of cytokines (INF  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 and IL-10); measurements of implant volumes before and at the end of the treatment protocol and histopathological study of the implant areas. From a dose of 50mg/kg/day, a reduction in the pain threshold was observed in the behavioral tests applied. In the T50 and T100 groups, low levels of TNF  $\alpha$  and IL6 were maintained in addition to a reduction in IL10 expression. Very similar levels of IFN- $\gamma$  were observed between the treated groups and the SHAM group. The T50, T100 and leuprolide groups obtained the least preservation of the ectopic epithelium, indicating a reduction in endometriotic implantation. In the model studied, thalidomide had an analgesic, anti-inflammatory action and reduced the size of the implants, more significantly with doses starting at 50 mg/kg/day, and can be suggested as an option in the treatment of endometriosis pain.

Palavras-chave: endometrium; rodents; inflammation; pain; analgesia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Estrutura química dos enantiômeros da talidomida .....                                                | 26 |
| Quadro 1 – Classificação do crescimento dos implantes endometriais .....                                         | 32 |
| Figura 2 – Avaliação subjetiva das mudanças nas orelhas pela MGS em ratos .....                                  | 35 |
| Quadro 2 – Escores de avaliação da persistência de células epiteliais em autotransplantes<br>de endométrio ..... | 37 |
| Gráfico 1 – Avaliação da dor espontânea pelo teste <i>Mouse Grimace Scale</i> .....                              | 39 |
| Gráfico 2 – Avaliação da alodinia mecânica utilizando o do teste VonFrey .....                                   | 41 |
| Gráfico 3 – Avaliação da atividade motora/deambulação forçada usando o <i>rotarod teste</i> .....                | 42 |
| Gráfico 4 – Avaliação da concentração de TNF $\alpha$ em 2 momentos, D7 e D21 .....                              | 43 |
| Gráfico 5 – Avaliação da concentração de INF $\gamma$ em 2 momentos, D7 e D21 .....                              | 43 |
| Gráfico 6 – Avaliação da concentração de IL-6 em 2 momentos, D7 e D21 .....                                      | 44 |
| Gráfico 7 – Avaliação da concentração de IL-10 em 2 momentos, D7 e D21 .....                                     | 45 |
| Figura 3 – Fotomicrografias dos epitélios endometrióticos (setas) .....                                          | 46 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|               |                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------|
| AINEs         | Anti-Inflamatórios Não Esteroidais                             |
| ANOVA         | <i>One-Way Analysis of Variance</i>                            |
| AVC           | Acidente Vascular Cerebral                                     |
| COBEA         | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal                    |
| COCs          | Contraceptivos Orais Combinados                                |
| CONCEA        | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal         |
| COX-2         | Ciclo-Oxigenase-2                                              |
| D14           | 14º dia                                                        |
| D21           | 21º dia                                                        |
| D21           | Dia de Início do Tratamento                                    |
| D7            | 7º dia                                                         |
| DPC           | Dor Pélvica Crônica                                            |
| EUA           | Estados Unidos da América                                      |
| FDA           | <i>Food and Drug Administration</i>                            |
| FGF-2         | <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>                              |
| GnRH          | <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>                          |
| IL-1          | Interleucinas 1                                                |
| IL-2          | Interleucinas 2                                                |
| IL-6          | Interleucinas 6                                                |
| IL-8          | Interleucinas 1                                                |
| LEED          | Laboratório Experimental para Estudos da Dor                   |
| MGS           | <i>Mouse Grimace Scale</i>                                     |
| MMPs          | Matriz Metaloproteinase                                        |
| RDC           | Resolução da Diretoria Colegiada                               |
| RM            | Ressonância Magnética                                          |
| SBCAL         | Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório      |
| SNC           | Sistema Nervoso Central                                        |
| STEPS         | <i>System for Thalidomide Education and Prescribing Safety</i> |
| TCE           | Traumatismo Cranioncefálico                                    |
| TNF- $\alpha$ | Fator De Necrose Tumoral                                       |
| UFMA          | Universidade Federal do Maranhão                               |
| VEGF          | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>                      |

## SUMÁRIO

|              |                                                                                |           |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                         | <b>12</b> |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                               | <b>14</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Endometriose.....</b>                                                       | <b>14</b> |
| 2.1.1        | A doença .....                                                                 | 14        |
| 2.1.2        | Classificação .....                                                            | 15        |
| 2.1.3        | Etiologia.....                                                                 | 16        |
| 2.1.4        | Fisiopatologia da endometriose.....                                            | 17        |
| 2.1.5        | Endometriose e dor .....                                                       | 18        |
| 2.1.6        | Diagnóstico .....                                                              | 20        |
| 2.1.7        | Tratamento.....                                                                | 21        |
| 2.1.8        | Modelos experimentais em endometriose .....                                    | 23        |
| <b>2.2</b>   | <b>Talidomida e mecanismo de ação .....</b>                                    | <b>24</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                         | <b>29</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Objetivo geral.....</b>                                                     | <b>29</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Objetivo específicos.....</b>                                               | <b>29</b> |
| <b>4</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                               | <b>30</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>Tipo de estudo, período, local.....</b>                                     | <b>30</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>Aspectos éticos .....</b>                                                   | <b>30</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>Protocolo experimental.....</b>                                             | <b>30</b> |
| <b>4.3.1</b> | <b>Animais .....</b>                                                           | <b>30</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>Protocolo experimental .....</b>                                            | <b>31</b> |
| 4.4.1        | Indução da endometriose experimental (primeira cirurgia).....                  | 31        |
| 4.4.2        | Confirmação do diagnóstico da endometriose (segunda cirurgia) .....            | 32        |
| <b>4.5</b>   | <b>Avaliação clínica da dor .....</b>                                          | <b>33</b> |
| 4.5.1        | Avaliação da dor espontânea .....                                              | 33        |
| 4.5.2        | Teste de Von Frey: Avaliação da Alodinia Mecânica .....                        | 35        |
| 4.5.3        | Avaliação de atividade motora/deambulação forçada ( <i>RotaRod Test</i> )..... | 36        |
| <b>4.6</b>   | <b>Dosagem de citocinas.....</b>                                               | <b>36</b> |
| <b>4.7</b>   | <b>Eutanásia .....</b>                                                         | <b>36</b> |
| <b>4.8</b>   | <b>Análise histopatológica.....</b>                                            | <b>37</b> |
| <b>4.9</b>   | <b>Análise estatística .....</b>                                               | <b>37</b> |
| <b>5</b>     | <b>RESULTADOS .....</b>                                                        | <b>39</b> |

|      |                                                           |    |
|------|-----------------------------------------------------------|----|
| 5.1  | Avaliação da dor espontânea .....                         | 39 |
| 5.2  | Avaliação da alodínia mecânica.....                       | 40 |
| 5.3  | Avaliação da atividade motora / deambulação forçada ..... | 41 |
| 5.4  | Determinação da concentração do TNF $\alpha$ .....        | 42 |
| 5.5  | Determinação da concentração do INF $\gamma$ .....        | 43 |
| 5.6  | Determinação da concentração de IL-6 .....                | 44 |
| 5.7  | Determinação da concentração de IL-10 .....               | 44 |
| 5.8  | Análise volumétrica dos implantes .....                   | 45 |
| 5.9  | Avaliação histológica .....                               | 46 |
| 5.10 | Artigo 1 .....                                            | 47 |
| 5.11 | Artigo 2 .....                                            | 65 |
| 6    | DISCUSSÃO .....                                           | 76 |
| 7    | CONCLUSÃO .....                                           | 81 |
|      | REFERÊNCIAS.....                                          | 82 |
|      | ANEXOS.....                                               | 92 |

## 1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma condição crônica, caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, mais comumente no peritônio pélvico, nos ovários e septo retrovaginal. É uma doença inflamatória estrogênio dependente e de natureza multifatorial que acomete 6% a 10% das mulheres em idade reprodutiva, o que representa cerca de 176 milhões de mulheres no mundo. Nas que apresentam dor pélvica crônica, esse valor pode chegar até 82% e nas submetidas à investigação por infertilidade entre 20 e 50% (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021; LIU, 2017; INTERNATIONAL WORKING GROUP OF AAGL *et al.*, 2021).

As evidências científicas confirmam a natureza multifatorial da endometriose, que é o resultado da contribuição combinada de fatores anatômicos, hormonais, imunológicos, estrogênicos, genéticos e ambientais em mulheres afetadas. Os sintomas mais comuns (dor pélvica e fluxo menstrual irregular) podem estar relacionados à atividade inflamatória intensa e à distorção da anatomia pélvica devido a aderências ectópicas e ação de proteínas específicas (AERTS *et al.*, 2018; TOMASSETTI; D'HOOGHE, 2018).

Normalmente, o refluxo do tecido endometrial é eliminado do peritônio pelo sistema imunológico e a desregulação deste mecanismo de depuração tem sido relacionada à predisposição para a implantação e crescimento de células endometriais. A interação entre citocinas contribuem para a progressão da doença com a implantação de células endometriais (SIKORA *et al.*, 2017).

O tratamento pode ser clínico e/ou cirúrgico, sendo que as terapias medicamentosas são preferencialmente aquelas que interferem no ciclo menstrual, induzindo pseudo gravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica, proporcionando melhora clínica, porém seus efeitos não são curativos, o que justifica a busca de novos tratamentos. A talidomida é uma droga imunomoduladora, que apesar da conhecida teratogenicidade, hoje está positivamente relacionada ao tratamento de diversas condições clínicas, por suas propriedades pleiotrópicas, anticarcinogênicas, incluindo imunomodulação, efeitos antiangiogênicos, anti-inflamatórios e anti-proliferativos (ANTÔNIO *et al.*, 2019; AZIMIRAD *et al.*, 2014; BAKACAK *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2019).

Segundo Marsol (2013), a talidomida inibe as respostas mediadas pela imunidade inata, ao diminuir a expressão de moléculas de adesão na superfície das células inflamatórias, e a secreção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), e prostaglandina E2 (mediada pela inibição da enzima ciclooxygenase 2). É

também capaz de inibir a fagocitose, a migração celular e a liberação de mediadores antimicrobianos por neutrófilos.

As citocinas IL-6, interleucinas 1 (IL-8) e TNF- $\alpha$  estão elevadas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose em comparação com mulheres sem endometriose. O aumento de TNF- $\alpha$  foi correlacionado ao aumento de IL-8, citocina propulsora do crescimento autócrino no endométrio, e pode promover um ciclo vicioso das células endometriais, levando a inflamação aguda e estágio crônico, contribuindo assim com a patogênese da endometriose. Desta forma, pode-se inferir que a supressão de IL-8 pode contribuir positivamente para a diminuição da proliferação de células endometriais (BAKACAK *et al.*, 2015; YAGYU *et al.*, 2005; RAJKUMAR, 2019).

A atividade antiangiogênica da droga pode ser explorada no tratamento de alguns cânceres nos quais a neovascularização desempenha um papel na patogênese da doença. Relatos de tratamentos bem sucedidos de eritema nodoso hansênico e de mieloma múltiplo já foram evidenciados, tornando o medicamento popular em campos de pesquisa para o tratamento de diferentes doenças, fenômeno este conhecido como redescoberta do medicamento (BULUN *et al.*, 2010; COOK; FIGG, 2010; KUMAR; RAJKUMAR, 2006).

Embora várias abordagens ao tratamento da endometriose tenham sido sugeridas na medicina nos últimos anos, ainda não há tratamento ideal. Atualmente, a cirurgia tem sido proposta como o tratamento terminal da doença. As terapias hormonais, os agentes anti-inflamatórios e as terapias complementares em uso atual tendem a aliviar os sintomas algícos, entretanto, apresentam perfis de efeitos adversos insatisfatórios (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021).

Visto a ação da talidomida nos fatores, co-fatores e vias de sinalização responsáveis pelo processo inflamatório e nociceptivo, esta pode ser uma possibilidade farmacoterapêutica para o manejo das crises algícas em pacientes acometidas por endometriose. Desta forma, justifica-se o uso da talidomida na presente pesquisa utilizando o modelo induzido de endometriose, considerando que há uma escassez de estudos clínicos abordando análise comportamental com objetivo de avaliar o controle da dor promovido por esse fármaco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Endometriose

#### 2.1.1 A doença

A endometriose é uma doença ginecológica comum, não maligna, com relação direta ao estrogênio. É definida pelo aparecimento e desenvolvimento de tecido ectópico fora da cavidade uterina, sobretudo em órgãos pélvicos e abdominais, afetando a qualidade de vida e a capacidade reprodutiva das mulheres. Usualmente se desenvolve na pelve, peritônio, ovários, tubas uterinas, serosa do útero e no septo reto-vaginal. Em alguns casos, a doença pode progredir e acometer órgãos não genitais, como o intestino, sobretudo reto e sigmoide, bexiga ou ureteres (LAGANÀ *et al.*, 2017).

Os principais sinais e sintomas são a dismenorreia, dispareunia de profundidade, dor pélvica ou abdominal não cíclica e infertilidade. Entretanto, quando acomete órgãos não genitais, como intestino e bexiga, sintomas como puxo e tenesmo, sensação de esvaziamento intestinal incompleto, sangramento intestinal cíclico, podem estar presentes. É também capaz de apresentar-se de forma assintomática, sendo diagnosticada quando a paciente é avaliada por infertilidade. Comumente, há uma demora desde os sintomas iniciais e o diagnóstico, chegando a serem tornos de sete anos, não apenas por conta de sua sintomatologia inespecífica, mas também por desconfiança clínica assim como a falta de interação entre as especialidades ditas como não ginecológicas (ANDRES *et al.*, 2019; BERALDO *et al.*, 2018; GREENE *et al.*, 2016; JOSEPH; MAHALE, 2019; PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017).

A Organização Mundial da Saúde estima que quase 180 milhões de mulheres enfrentam endometriose no mundo. Os custos anuais com a doença chegam a 22 bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos da América (EUA), sendo a terceira causa ginecológica de hospitalização. e uma das principais causas de infertilidade em mulheres jovens (ZONDERVAN *et al.*, 2018).

No Brasil, uma a cada dez mulheres em idade reprodutiva sofre com esta patologia. A prevalência é mais elevada em jovens tendo provável relação com mecanismos fisiopatológicos da doença e com fatores de risco associados a essa faixa etária (ANTÔNIO *et al.*, 2019; FOTI *et al.*, 2018; MARQUI, 2015). Salomé *et al.* (2020), identificaram mais de 59 mil casos de internação por endometriose entre os anos de 2015 e 2019, onde 43% estavam na

região sudeste e 26% na região nordeste, sendo o perfil bem característico para a doença como: mulheres casadas, em idade reprodutiva e nulíparas.

Diversos fatores de risco englobam a endometriose e o fator reprodutivo tem sido relacionado ao desenvolvimento da doença. A variação hormonal indica significativo risco, evidenciada pela idade precoce da menarca com idade a partir de 11 anos, curta duração entre os ciclos menstruais, assim como menstruações pesadas e longas. A diminuição das taxas de fecundidade como resultado direto do estilo de vida da mulher contemporânea também tem contribuído significativamente para o aumento das taxas de endometriose. Isso justifica-se pelo fato de a ausência de gestações, o endométrio prolifera continuamente e descama sob o controle do ciclo menstrual (ALIMI *et al.*, 2018; PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017).

Outro fator também que parece ser um importante regulador da secreção e manutenção dos níveis circulantes de estrógenos em mulheres na idade reprodutiva é o ritmo circadiano. Dessa forma, o trabalho noturno tem sido associado a alterações marcantes da secreção de estrógenos e, conseqüentemente, a irregularidades menstruais e ao aumento do risco de endometriose. Recentemente, foi demonstrado que qualquer trabalho noturno em geral aumenta o risco de endometriose em 50%. Multíparas, lactantes, menarca tardia, uso de contraceptivos orais com baixa dose e atividade física regular são considerados como potenciais fatores de proteção no desenvolvimento da patologia (COSTA; MEJIA, 2018; NASCIMENTO, 2017).

### 2.1.2 Classificação

As lesões endometrióticas são frequentemente detectadas nos ovários, ligamentos do útero, área cérvico-vaginal, parede abdominal e umbigo, trato urinário ereto. Frente a localização das lesões, um novo conceito foi proposto dividindo a endometriose em três classificações distintas: peritoneal, ovariana e endometriose profunda. A peritoneal caracteriza-se pela presença de implantes superficiais no peritônio; a ovariana, por implantes superficiais no ovário ou cistos (endometriomas); e endometriose profunda, que é definida como uma lesão que penetra no espaço retroperitoneal ou na parede dos órgãos pélvicos, com profundidade de 5 mm ou mais (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021; LAGANÀ *et al.*, 2017; VETVICKA *et al.*, 2016).

O sistema de estadiamento da endometriose mais utilizado foi definido pela American Society for Reproductive Medicine em 1997, que classifica a gravidade da endometriose em quatro diferentes estágios, considerado o tamanho, a profundidade e a

localização dos implantes endometrióticos e a gravidade das aderências, sendo: Estágio 1 (doença mínima): implantes isolados e sem aderências significativas; Estágio 2 (doença leve): implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significativas; Estágio 3 (doença moderada): múltiplos implantes, aderências peritubárias e periovarianas evidentes; Estágio 4 (doença grave): múltiplos implantes extensos, superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes (WANG *et al.*, 2013; ZONDERVAN *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Etiologia

Com o desenvolvimento da histologia, endocrinologia e das técnicas cirúrgicas no século XX, houve um melhor entendimento da fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da endometriose. Apesar dos avanços, uma teoria unificante para essa doença continua como um ponto pouco esclarecido. De fato, várias teorias têm surgido a partir de evidências relacionadas à patogênese (SANTOS *et al.*, 2012; CORRÊA, 2014).

A endometriose é considerada multifatorial na sua origem e constantemente mencionada como a “doença das teorias”. A menstruação retrógrada é a teoria mais aceita, distinguida pela exteriorização do revestimento endometriótico, por intermédio das tubas uterinas evidenciadas na região pélvica. O crescimento de tecido endometrial em espaços ectópicos poder ser resultado desse fluxo retrógrado. Esses fluidos conteriam células tronco endometriais anormais que teriam capacidade de implantação e angiogênese para formar novos focos quando expostos à cavidade peritoneal. Essa teoria é suportada pelo fato de que cerca de 75 - 90% das mulheres experienciam algum grau de fluxo retrógrado durante os períodos perimenstrual do ciclo (JOSEPH; MAHALE, 2019; PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017; PODGAEC, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

Outras teorias também são discutidas na literatura como a metaplasia celômica, que descreve a origem das lesões de endometriose a partir dos tecidos normais mediante processo de diferenciação metaplásica. Há também evidências clínicas e experimentais sobre a teoria genética que justifica o surgimento da patologia devido predisposição genética ou alterações epigenéticas associadas a modificações no ambiente peritoneal (fatores inflamatórios, imunológicos e hormonais) podendo iniciar a doença nas suas diversas formas (NÁLCUL; SPRITZER, 2010).

A etiologia da endometriose é uma interação complexa associando fatores ambientais, imunológicos, genéticos e principalmente hormonais. Embora não haja um consenso quanto ao principal fator, adota-se como orientação principal como uma condição de

saúde multifatorial. Ademais, ressalta-se que o estrógeno em particular executa uma função primordial, desenvolvendo o tecido ectópico endometrial por meio de alterações hormonais no decorrer do ciclo menstrual, favorecendo as aderências e auxiliando no desenvolvimento da doença (JOSEPH; MAHALE, 2019; PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017; PODGAEC, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

#### 2.1.4 Fisiopatologia da endometriose

É caracterizada por um intenso processo inflamatório peritoneal. Após o tecido endometrial alcançar a pelve, alguns episódios não totalmente compreendidos se iniciam. As enzimas representadas pela Matriz Metaloproteinase (MMPs) degradam os componentes estruturais da matriz extracelular, facilitando adesão no revestimento peritoneal e subsequente invasão das células endometriais (BULUN *et al.*, 2010).

O tecido ectópico gera um processo inflamatório com elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 $\beta$ , interleucinas-6 e TNF- $\alpha$ , este produzido por ativação de linfócitos, macrófagos e células natural killer, aumentando a produção de prostaglandinas por células endometriais e iniciando um surto de citocinas inflamatórias. O TNF- $\alpha$  também regula a produção do MMPs, potencializando a degradação da matriz extracelular e diminuindo o efeito de seus inibidores, aumentando a ação das MMPs seguido da invasão mesotelial (BULUN *et al.*, 2010; JANSEN; CODDINGTON, 2010).

Os fenômenos vasculares ocasionados devido a agressão celular são mediados principalmente pela histamina, resultando em um aumento localizado e imediato da irrigação sanguínea. Em seguida, tem início a produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico pelo qual células polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o foco da lesão. Essas células, por sua vez, realizam fagocitose dos elementos que originam a inflamação e produzem mais mediadores químicos, entre os quais estão as citocinas (TNF- $\alpha$  e as interleucinas), quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos e ativação das plaquetas e coagulação sanguínea (LIU *et al.*, 2011; MOWERS, 2016).

A reação inflamatória é gerada devido a manifestações locais e sistêmicas, caracterizadas pela produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, além da elevação da expressão de Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em células estromais endometriais e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose. A expressão do COX-2 é aumentada em células estromais endometriais e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose. O

estradiol age por meio de receptores de estrogênio  $\beta$  estimulando a produção de COX-2, levando à superprodução de prostaglandinas (LIU *et al.*, 2011; MOWERS, 2016).

Alterações imunológicas celulares e humorais também podem estar envolvidas, tanto no estabelecimento quanto na determinação da progressão da doença. Estudos descrevem a presença de células como linfócitos, células natural killer, macrófagos ativados, além de concentração elevada de interleucinas 2 (IL-2) em fluido peritoneal de mulheres doentes, contribuindo para a persistência e progressão de focos de endometriose. A expressão do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) também se encontra aumentada na pelve das pacientes com endometriose, induzindo a angiogênese e neovascularização dos focos endometrióticos, além de contribuir para a formação de aderências e induzir a produção de COX-2 (BULUN *et al.*, 2010; JANSEN; CODDINGTON, 2010).

Mudanças no metabolismo de estrogênio também já foram detectadas nos implantes ectópicos. O fator esteroidogênico 1 envolvido na síntese do estradiol, pode ser identificado nos focos de endometriose, porém está ausente no endométrio. O aumento do estradiol eleva a atividade local do COX-2, resultando na produção aumentada de prostaglandinas E2, ativando a aromatase e resultando em produção de estradiol adicional, sendo um importante fator para a sobrevivência e manutenção da endometriose (IVERSEN; SEYER-HANSEN; FORMAN, 2017).

#### 2.1.5 Endometriose e dor

A dor é originada pelo sistema nervoso central (SNC) com a função de proteger e advertir o corpo em relação aos impulsos que podem ser nocivos para o organismo. No entanto, quando esta se torna crônica instantaneamente é considerada patológica e geralmente perdura logo depois de um estímulo, como resultado da readaptação das funções e estruturas do SNC que asseguram o reconhecimento da dor e contribui para a sua propagação em diversas regiões (AREDO *et al.*, 2017).

De maneira geral, a dor também é uma percepção ou experiência emocional ou física desagradável, proveniente de um dano tecidual real ou potencial. A algesia é classificada aguda ou crônica, podendo ter uma classificação também de acordo com seu mecanismo fisiopatológico (RAJA *et al.*, 2020).

O conjunto dos eventos que iniciam o processo sensitivo-doloroso é a conversão dos estímulos ambientais, químicos ou físicos com capacidade de gerar lesão tissular, em potenciais de ação, a partir dos nociceptores. Esses são um grupo constituído exclusivamente pelas terminações nervosas livres presentes nas fibras mielínicas finas delta A e amielínicas C.

Mediante os estímulos que ativam essas vias, esses se classificam como termomecânicos, químicos e polimodais inespecíficos (ALVES, 2017).

Quanto a sua origem, a dor pode ser de preponderância nociceptiva, neuropática e mista. A dor nociceptiva, sucede pela ativação de receptores de dor e ligados à tecidos ósseos, musculares ou ligamentares e tem boa resposta a classes terapêuticas mais comuns como analgésicos ou anti-inflamatórios não esteroides (MENDES; MACHADO; LINARTEVICH, 2020).

A dor neuropática é conceituada como aquela iniciada por lesões ou disfunções localizadas no sistema nervoso, geralmente advindo de uma ativação atípica da via da dor ou nociceptiva. Inversamente à nociceptiva, a dor de origem neuropática é pouco responsiva aos analgésicos tradicionais (KRAYCHETE *et al.*, 2008).

A dor visceral, que se manifesta nos órgãos internos como útero, bexiga, reto e a dor somática, que é percebida quando ocorre um estímulo dos nervos sensoriais presentes na pele e nos tecidos profundos. A paciente com endometriose experimenta um conjunto complexo dos dois tipos de dores em níveis diferentes e estas experiências podem ter impacto negativo em relação a qualidade de vida daquelas que as vivenciam (ALIMI *et al.*, 2018).

A dor relativa à endometriose pode ser responsabilizada pela elevação de mediadores inflamatórios, disfunção neurológica e neuromodulação permeada por estrogênio dos neurônios sensoriais periféricos. Estudos demonstraram crescente os números de células inflamatórias, sendo estas macrófagos e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$  nas lesões endometriais. A produção elevada de prostaglandina, juntamente com a inflamação crônica, está relacionada à dor (RAFIQUE; DECHERNEY, 2017).

A diversidade de alterações histológicas e moleculares identificadas no endométrio de mulheres acometidas com endometriose, indica que as alterações primárias neste tecido, podem ter um papel importante no início da doença, e até mesmo na evolução dos sintomas. Estudos confirmam que fatores de crescimento locais ou citocinas para fibras nervosas que, se também presentes no tecido endometrial ectópico de pacientes com endometriose, poderiam induzir o crescimento dos potenciais de ação nas fibras nervosas e nos focos de endometriose, fornecendo um mecanismo de lesão e dor específico (TOKUSHIGE *et al.*, 2006; TOKUSHIGE *et al.*, 2007).

A endometriose é constantemente referida por meio da dor pélvica que é evidenciada em diferentes formas, sendo mais frequente sinais e sintomas como dismenorreia e dispareunia, podendo ser manifestada também por disquezia, disúria e até infertilidade. Tem relação direta ao acúmulo de prostaglandina principalmente do subtipo E2 e F2 $\alpha$ , sendo o

primeiro um estimulante da produção de estrogênio. A dor na região inferior ao umbigo com duração de no mínimo 6 meses é estabelecida como dor pélvica crônica (DPC) e destaca-se por ser o sinal mais comum da endometriose (AREDO *et al.*, 2017; GREENE *et al.*, 2016; RAFIQUE; DECHERNEY, 2017).

Pouco é abordado em como as lesões endometrióticas estimulam o sistema nervoso, tendo como provável mecanismo a inervação mediante o surgimento neural de fibras sensoriais e simpáticas que se alojam nos vasos sanguíneos aproximados. Visto que as lesões necessitam ser vascularizadas para que sobrevivam e se expandam, a multiplicação dos vasos sanguíneos no decorrer do crescimento da lesão possibilita a entrada concomitante dos nervos, uma vez que os fatores que agem sobre o desenvolvimento dos vasos sanguíneos são os mesmos que agem nas fibras nervosas (AREDO *et al.*, 2017).

#### 2.1.6 Diagnóstico

Os sintomas inespecíficos e a estigmatização são dificuldades que permeiam o diagnóstico de endometriose bem como, a ausência de biomarcadores definitivos e a falta de conhecimento tanto do público geral quanto dos profissionais de saúde. Esses fatores contribuem para que a média de tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico efetivo seja de sete anos (PODGAEC *et al.*, 2018; ZONDERVAN; BECKER; MISSMER, 2020).

Para a identificação da doença é necessário a história clínica da paciente visto que amaior parte demonstra normalidade no exame físico, que é feito mediante a palpação para encontrar possíveis sensibilidades, seja ela uterina, fixação retrovertida ou qualquer tipo de massa pélvica, sendo a palpação do fórnice posterior o mais encontrado. Um exame físico sem alterações não descarta endometriose e deve-se optar por realizá-lo durante a menstruação, o que pode aumentar e melhorar a detecção dos achados (PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017). O primeiro exame de imagem a ser solicitado na paciente com história e exame físico sugestivo de endometriose é a ultrassonografia pélvica transvaginal, preferencialmente com preparo intestinal, já que se trata de um exame amplamente disponível e de baixo custo. Por meio deste há facilitação no diagnóstico de endometriomas, fibroides e cistos no ovário, fornecendo uma visualização do endométrio e da cavidade uterina (PARASAR; OZCAN; TERRY, 2017).

A videolaparoscopia era considerada padrão-ouro para a detecção da doença devido à visualização e inspeção direta dos focos de endometriose. Porém, com o avanço dos

métodos por imagem, é indicada para o diagnóstico, apenas as pacientes que apresentam exames normais e falha no tratamento clínico descartado (ALIMI *et al.*, 2018).

Atualmente, nenhum marcador bioquímico pode elucidar precisamente a endometriose, porém o Ca-125, quando coletado no primeiro ou segundo dia do ciclo menstrual, pode ser útil para o diagnóstico da endometriose em estágio avançado, principalmente quando os valores são superiores a 100 UI/ml. Embora concentrações normais não excluam a doença, casos com níveis elevados no pré-operatório podem auxiliar no acompanhamento da paciente e na suspeita clínica de recidiva da endometriose (HIRSCH *et al.*, 2016).

A ressonância magnética (RM) possui alta sensibilidade e especificidade tem sido recomendada como técnica que fornece melhor investigação de endometriomas e da endometriose infiltrativa profunda, sobretudo como teste pré-operatório. Durante o exame deverá ser contemplado a avaliação do útero, a região retro e a paracervical, os ligamentos redondos e os uterossacros, o fórnice vaginal posterior, o septo retovaginal, o retossigmoide, o apêndice, o ceco, o íleo terminal, a bexiga, os ureteres, os ovários, as tubas e as paredes pélvicas, que são locais mais frequentes da doença (FOTI *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que os exames deverão ser executados por profissionais com experiência nessa área. É importante destacar que o diagnóstico especializado por imagem é muito eficiente na detecção e no estadiamento de lesões profundas e dos endometriomas ovarianos, mas só esporadicamente é possível visualizar lesões superficiais. Diversos achados nos exames físicos, de imagem e laboratoriais podem auxiliar na investigação da endometriose. Um diagnóstico clínico precoce da doença pode evitar procedimentos invasivos, além de diminuir as consequências relacionadas com o desfecho do quadro clínico (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021; NASCIMENTO, 2017).

#### 2.1.7 Tratamento

O tratamento da endometriose busca o alívio da dor e a recuperação da fertilidade, podendo ser clínico e/ou cirúrgico. A terapêutica clínica geralmente é a primeira linha seguida com a função do alívio da dor, no controle da doença e suprimir o tecido endometriótico que está hormonalmente ativo. O tratamento cirúrgico deve ser oferecido às pacientes em que o tratamento clínico for ineficaz ou contraindicado por alguma razão (RAFIQUE; DECHERNEY, 2017).

Diante a alta prevalência da doença e grave problema de saúde pública, o tratamento farmacológico vem sendo utilizado, como primeira opção. Baseia-se na supressão do ciclo menstrual induzindo pseudogravidez, pseudomenopausa ou anovulação crônica, criando um ambiente inadequado para o crescimento e manutenção dos implantes da endometriose. O efeito da terapêutica medicamentosa não é curativo, e as drogas possuem efeitos colaterais significativos, o que justifica a busca de novas alternativas (RAFIQUE; DECHERNEY, 2017).

As drogas consideradas de primeira linha para o tratamento clínico da endometriose são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), progestágenos e contraceptivos orais combinados contendo estradiol e progestina (contraceptivos orais combinados – COCs) administrados de forma contínua ou cíclica. As terapias de segunda linha incluem formulações de depósito injetáveis de agonistas do hormônio liberador de gonadotropina (*Gonadotropin-Releasing Hormone* – GnRH), como acetato de leuprolida. Também são utilizados fármacos de outras classes como as progestinas e opioides.

Estas opções de tratamento apresentam certas limitações, como eficácia insuficiente na doença (COCs, AINEs), problemas de tolerabilidade, incluindo sangramento irregular, inchaço e ganho de peso, efeitos colaterais hipoestrogênicos graves (agonistas GnRH, inibidores de aromatase) e risco de vício (opíoides), limitando o uso por períodos prolongados (DUNSELMAN *et al.*, 2014; FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021; GIUDICE, 2010; ZONDERVAN *et al.*, 2018).

Os agonistas do receptor do GnRH são atualmente usados clinicamente para a dor da endometriose e terminam por induzir a menopausa médica pela regulação negativa dos receptores hipotalâmicos reduzindo os níveis séricos de gonadotrofina e estrogênio, desse modo suprimindo a ovulação. Em estudo recente de pacientes com endometriose, o uso prolongado desses agentes também foi associado a outros efeitos colaterais, como perda de memória, insônia, fogachos e perda de massa óssea (GALLAGHER *et al.*, 2018; VERCELLINI *et al.*, 2011).

O agonista leuprolida, aprovado para o tratamento da endometriose em vários países e com características anti-inflamatória, analgésica, antiangiogênica e antitumoral já devidamente estabelecidas na prática clínica e literatura, vem sendo devidamente explorado nos últimos anos em estudos de endometriose experimental (ALTINBAS *et al.*, 2015; CELIK *et al.*, 2016; ERCAN *et al.*, 2014; ONALAN *et al.*, 2014; SIMSEK *et al.*, 2014; TEKIN *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por Tekin *et al.* (2015), que compararam por 14 dias os efeitos anti-inflamatórios e antiangiogênicos do acetato de leuprolida (1mg/kg/DU, subcutânea)

e do resveratrol (30mg/kg/14dias, intramuscular) em um modelo experimental de endometriose, reduções significativas dos volumes de implantes endometrióticos, grau histopatológico e imunorreatividade à metaloproteinases e VEGF, assim como dos níveis plasmáticos de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  foram obtidas.

Além disso, terapias complementares como acupuntura, fisioterapia do assoalho pélvico, psicoterapia, uso de adjuvantes no tratamento da dor como gabapentina e amitriptilina, são alguns exemplos de alternativas que podem ser indicadas no seguimento das pacientes com endometriose sintomática, com objetivo de otimização da analgesia (MONTENEGRO *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2017).

A técnica cirúrgica da laparoscopia é indicada quando os sintomas são graves e recidivantes ao tratamento com contraceptivos orais combinados (primeira linha) ou progestágenos, em casos de endometriomas, de distorção da anatomia das estruturas pélvicas, de aderências, de obstrução do trato intestinal ou urinário e nas pacientes com infertilidade associada à endometriose. Tem como objetivo remover todos os focos visíveis e/ou palpáveis de endometriose em uma única cirurgia diminuindo, desta forma, os escores de dor e melhorando a qualidade de vida e a fertilidade (ANDRES; BORRELLI; ABRÃO, 2009; FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2021).

#### 2.1.8 Modelos experimentais em endometriose

A construção de modelos *in vitro* ou *in vivo* que validam as características intrínsecas da endometriose é uma atividade desafiadora, apresentando mecanismos fisiopatológicos complexos, pois o diagnóstico da doença é geralmente tardio e os sintomas são comuns a outras doenças ginecológicas. Dadas as limitações e as considerações éticas da experimentação humana, estudiosos da área da endometriose consideram que modelos de animais como os ratos, camundongos e primatas não humanos são os melhores, pois representam com melhor fidelidade as características fisiológicas e genéticas dos humanos (BRUNER-TRAN *et al.*, 2018; MALVEZZI *et al.*, 2020).

Story e Kennedy (2004) definem que os modelos murinos são os mais utilizados, pois a técnica operatória é simples com êxito dos implantes. Além disso, a escolha deste modelo é baseada em baixo custo e na resistência desses animais às infecções. Entretanto, as comparações são dificultadas pelo grande número de técnicas experimentais utilizadas e pela ampla lacuna filogenética entre não primatas e humanos. Contudo, uma das principais

limitações do modelo experimental com ratas em endometriose é que apenas lesões superficiais podem ser induzidas nesses animais e estas são consideradas mais simples e talvez os menos clinicamente importante (MALVEZZI *et al.*, 2020).

Vários modelos experimentais são descritos na literatura, como: Modelo experimental de Jones (1984), que consiste na fixação de fragmentos de endométrio retirados do corno uterino à parede lateral do abdome; Modelo de Vernon e Wilson (1985), que é a implantação de pequenos fragmentos de endométrio no mesentério e ligamento útero-ovárico desses animais; Modelo experimental de Sakata *et al.* (1990), onde são implantados fragmentos de endométrio sob a cápsula renal dos animais. Embora haja um crescimento no número de estudos pré-clínicos de endometriose, a tradução dos achados obtidos por estudos em modelos animais em ensaios clínicos tem sido escassos, principalmente associado a medicamentos não padronizados para tratar a doença, caracterizando lacunas na compreensão da doença, mecanismos fisiopatológicos e experimentação com novos compostos terapêuticos para endometriose (GUO; EVERS, 2013; MALVEZZI *et al.*, 2020).

Considerando os critérios deste estudo, optou-se pelo modelo experimental de Nogueira Neto *et al.* (2011) que é uma técnica fixação de autotransplante de retalhos de corno uterinos (tamanho 4x4 mm), para o mesentério próximo ao vaso que irriga o ceco. Desta forma, mantêm-se a superfície serosa do retalho em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal, onde nenhuma suplementação hormonal é administrada antes ou após o procedimento.

## **2.2 Talidomida e mecanismo de ação**

A talidomida foi descoberta em 1953 por Wilhelm Kunnz, na então Alemanha Ocidental. Sua primeira síntese foi realizada na indústria Chemie Grunenthal, tendo como objetivo ser agregada em antibióticos, representando uma inovação para a indústria farmacêutica vigente. Após novos estudos, constatou-se que o fármaco demonstrou propriedades hipnóticas e sedativas eficientes, baixa toxicidade com capacidade de indução do sono profundo e duradouro (VIANNA, 2013; SILVA; MELO, 2018).

O fármaco foi inicialmente utilizado como sedativo-hipnótico, e posteriormente no tratamento de resfriados, insônia, ansiedade e náuseas, principalmente em gestantes nos primeiros meses de gestação. Logo tornou-se um dos medicamentos líder de vendas no mercado, sendo apresentado pela empresa como totalmente atóxico, e poderia ser

comercializado sem prescrição médica (DINIZ; LEAL; Klier, 2015; MORO; INVERNIZZI, 2017).

A formulação da talidomida apresentou mais de 40 nomes comerciais bem como associação a outras substâncias, gerando fármacos para várias sintomatologias, como resfriados, tosse, enxaqueca e asma. Em muitos hospitais da Alemanha era utilizado como sedativo em crianças para a realização de exames de eletroencefalograma uma forma líquida do medicamento. Entretanto, não foram realizados testes de teratogenicidade (somente de toxicidade), muito embora naquela época já fosse sabido que muitas substâncias químicas, incluindo as de baixa toxicidade aguda em adultos, poderiam causar danos fetais (SILVA; MELO, 2018; VIANNA, 2013).

Devido ao marketing realizado pela empresa alemã sobre a efetividade e segurança do fármaco, a comercialização do medicamento se expandiu em vários países, inclusive no Brasil. Apesar do sucesso mundial do fármaco, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* – FDA) rejeitou a aprovação do medicamento, baseado nos sintomas de neurite periférica em adultos. Entretanto, foi disponibilizada por alguns médicos americanos que a receberam diretamente da Grunenthal, utilizando principalmente em enjoos no período gestacional (LEANDRO; SANTOS, 2015).

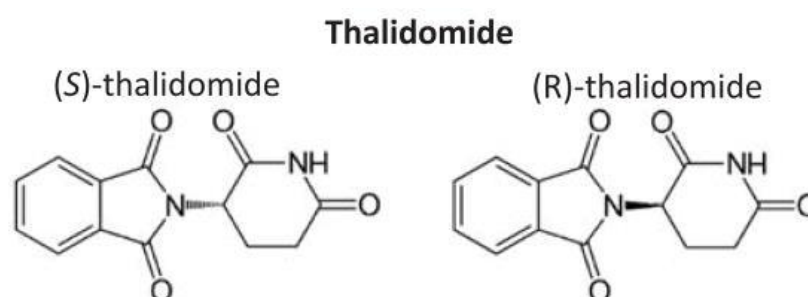
O primeiro caso de malformação congênita com relação a talidomida ocorreu do final de 1958, na Alemanha. Partindo desse pressuposto, os médicos alemães começaram a observar associação entre a talidomida e a crescente incidência de malformações congênitas, como ausência das extremidades superiores (ossos rádio e ulna) e, às vezes, deformidades nos membros inferiores. Além disso, houve relatos do aumento das taxas de aborto, natimortas ou que morriam logo após o nascimento (SILVA; MELO, 2018).

Dada a tragédia que a circundou, foi um dos medicamentos mais importantes do século XX em termos de mobilização da legislação de saúde, constituindo o ponto de partida para a aplicação dos conceitos de segurança e farmacovigilância dos medicamentos. Seu uso é cuidadosamente monitorado usando esquemas de sucesso como o programa *System for Thalidomide Education and Prescribing Safety* (STEPS), que monitora as pacientes para garantir que não estejam grávidas durante o tratamento (MORO; INVERNIZZI, 2017; UHL *et al.*, 2006; ZELDIS *et al.*, 1999).

A talidomida (a-N-ftalimidoglutarimida) é um análogo sintético do ácido glutâmico, um aminoácido natural envolvido em importantes processos fisiológicos, por exemplo, neurotransmissão cerebral e metabolismo. Formada por dois anéis ligados, um anel de glutarimida e um anel de fitalimida, possui um carbono quiral, que é instável e permite a

coexistência de dois enantiômeros S(–) e R(+), em uma mistura racêmica na proporção de 1:1, que podem alternar rapidamente entre os dois estados quando em fluidos corporais e na água. O S (–) determina as propriedades anti-TNF $\alpha$ , porém com ação teratogênica, já o R (+) efeito sedativo por ação direta e seletiva nos receptores dos centros do sono diencefálicos (Figura 1) (DIAMANTI *et al.*, 2015; FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004).

Figura 1 – Estrutura química dos enantiômeros da talidomida



Fonte: Vargesson (2009).

Recomenda-se administração por via oral principalmente à noite devido os efeitos sedativos. O pico no sangue é atingido em 2–6 h e amplamente distribuída nos tecidos e fluidos corporais devido à baixa afinidade com as proteínas plasmáticas. A meia-vida é de 5–7 horas, possuindo metabolização pelo citocromo P450; menos de 1% é eliminado inalterado pela urina, onde não é mais detectável após 48 h (BESSMERTNY; PHAM, 2002; FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004).

Apesar da sua teratogenicidade, a talidomida está sendo redescoberta por possuir um potente efeito antiangiogênico baseado na regulação negativa do VEGF. Além disso, é efetiva como imunomoduladora, imunossupressora e anti-inflamatória, pois atua na síntese excessiva do TNF- $\alpha$  e de outras citocinas, como a interleucina 6, que participa da gênese da dor inflamatória s (TSAI *et al.*, 2018).

Efeitos benéficos com a talidomida também foram observados em diversas dermatoses inflamatórias, incluindo, lúpus eritematoso cutâneo, eritema multiforme recorrente, úlceras aftosas recorrentes em pacientes com HIV, doença de Behçet, sarcoidose cutânea e pioderma granuloso. Outros estudos também demonstraram que o fármaco dentro do SNC reduziu a geração e secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF

e TNF-  $\alpha$  bem como efeitos antioxidantes e anti-apoptóticos em modelos de Acidente Vascular Cerebral (AVC) e Traumatismo Cranioncefálico (TCE) (HENEY *et al.*, 1991; MAJUMDER *et al.*, 2012; VALLET *et al.*, 2008; VOGELSANG *et al.*, 1992).

As propriedades anti-angiogênicas e antiproliferativas do fármaco vem desempenhando um papel importante na inibição do VEGF e do Fator de Crescimento Fibroblástico tipo 2 (*Fibroblast Growth Factor 2* – FGF-2). No início dos anos 1990, D’Amato *et al.* (1994), através de um modelo in vivo, de angiogênese da córnea em coelho, demonstrou um potente efeito inibidor deste processo pela talidomida e dessa forma sugeriram seu uso potencial para o tratamento de processos de doença dependentes de angiogênese. Desde então, a talidomida foi avaliada em vários tipos de câncer (ARRIETA *et al.*, 2002; MCFARLANE *et al.*, 2018; MARUOTTI; CANTATORE; RIBATTI, 2006; MOTZER *et al.*, 2002; PATT *et al.*, 2005; STRUPP *et al.*, 2002).

A talidomida possui doses terapêuticas em diferentes contextos clínicos. Um exemplo muito comum é a utilização no eritema nodoso hansênico, na qual possui doses típicas que variam de 100 a 300 mg/dia. Em doenças de maior severidade como o mieloma múltiplo, observa-se que a dose máxima administrada pode chegar a 400mg/dia avaliando que seu uso não é realizado de maneira contínua, sendo preferencialmente adotada a terapia em ciclos com intervalo entre as doses minimizando os efeitos adversos (CAMPOS *et al.*, 2021; THEOH; CHNG, 2021).

É sabido que a talidomida pode ser usada em diversas condições inflamatórias como por exemplo na Síndrome de Stevens-Johnson e doença de Behçet, onde as doses terapêuticas variam de 50 a 400mg/dia. Observa-se que o uso contínuo dessa medicação está associado a efeitos adversos graves, mesmo em doses mais baixas como é o caso da neuropatia periférica (CAMPOS *et al.*, 2021; RAJKUMAR, 2019).

A neuropatia tóxica representa um importante problema clínico no uso das substânciasquimioterápicas e no caso da talidomida uma polineuropatia periférica dolorosa, predominantemente sensorial, com incidência aproximada em 20-50% dos pacientes, vem ser o fator limitante da dose desse medicamento resultando muitas vezes em retardo ou até mesmo término prematuro de um tratamento de outra forma bem sucedido. O substrato histológico mostra degeneração axonal primária. Quanto ao prognóstico, é variável: 25% apresentam recuperação total com a suspensão do medicamento, 50% permanecem com dano neuronal irreversível e 25% com parestesia, sendo necessária uma supervisão clínica e neurofisiológica rigorosa (CAMPOS *et al.*, 2021; KIRCHMAIR *et al.*, 2007).

Os outros efeitos indesejáveis mais frequentes são sedação, presente em quase todos os doentes, constipação, edema periférico, secar da mucosa oral e nasal, sonolência, náuseas e eritema cutâneo. As reações menos frequentes são bradicardia, neutropenia, irregularidades menstruais, hipotireoidismo e hipertireoidismo. Sugere-se que a trombose venosa profunda aumenta se associada à quimioterapia no tratamento do mieloma múltiplo (RAJKUMAR, 2000; RAJKUMAR, 2019; PACHECO *et al.*, 2022).

A utilização da talidomida no Brasil, no entanto, está condicionada à definição de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas com critérios de controle de prescrição de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 24/2012. As mulheres em idade fértil poderão fazer uso somente após avaliação médica com exclusão de gravidez por meio de método sensível, e mediante a comprovação de utilização de, no mínimo, dois métodos efetivos de contracepção sendo pelo menos um método de barreira. Além disso, as pacientes devem assinar um consentimento informado antes de iniciar o tratamento. Caso ocorra neuropatia, o medicamento deve ser suspenso imediatamente (CAMPOS *et al.*, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da talidomida no tratamento de endometriose experimental induzida em ratas Wistar.

#### **3.2 Objetivo específicos**

- a) Avaliar a ação da talidomida no controle da dor espontânea;
- b) Avaliar a eficácia da talidomida na alodínia mecânica e hiperalgesia primária através dos testes clínicos comportamentais;
- c) Observar a ação anti-inflamatória da talidomida pela dosagem das citocinas  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\gamma$ , IL-6 e IL-10;
- d) Analisar a evolução macroscópica e histológica dos focos endometrióticos após tratamento.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo, período, local**

Este estudo experimental e analítico, foi realizado no período entre dezembro de 2019 a fevereiro 2020 no Laboratório Experimental para Estudos da Dor (LEED) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus São Luís.

### **4.2 Aspectos éticos**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMA, sob o número de Protocolo 23115.016944/2019-25 (ANEXO A). Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.3 Protocolo experimental**

#### **4.3.1 Animais**

Neste experimento, foram utilizadas 60 ratas *Wistar* adultas (2 meses de idade), procedentes do Biotério Central da UFMA, as quais foram mantidas em condições controladas de temperatura, luz e umidade (temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa 40 a 60% e ciclos claro/escuro de 12/12 horas). As ratas foram acompanhadas diariamente com registro de data, peso, substância administrada, aparência física, comportamento não provocado, resposta a estímulos externos, sinais clínicos, intercorrências e observações. Qualquer alteração nos parâmetros que incluíam mudanças na aparência, respiração, eliminações fisiológicas, dificuldades de locomoção, icterícia, anemia, sinais neurológicos e sangramentos foi avaliado pela equipe executora e também pelo médico veterinário que auxiliou durante pesquisa.

## 4.4 Protocolo experimental

### 4.4.1 Indução da endometriose experimental (primeira cirurgia)

As ratas foram submetidas a anestesia inalatória com isoflurano (indução 5%, manutenção 2%). Após a certificação do plano anestésico, com a perda do reflexo córneo-palpebral, realizou-se uma incisão sobre a linha mediana da parede abdominal com posterior exposição dos cornos uterinos e implantação intrauterina de tecido endometriótico (NEVES *et al.*, 2013).

Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com os membros em abdução. Realizou-se a antissepsia da região abdominal utilizando solução de clorexidina a 2%. A técnica de autotransplante foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Nogueira Neto *et al.* (2011).

Realizou-se uma incisão mediana de 3 cm será realizada com bisturi de lâmina n. 15, acometendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, seguido de identificação dos órgãos intracavitários e exposição do útero, anexos e mesentério. O procedimento cirúrgico seguiu com identificação, apreensão, ligadura e secção do terço médio do corno uterino esquerdo usando fio de nylon 6-0 (Mononylon®, Ethicon, São Paulo, Brasil) com três pontos simples e hemostasia.

Concomitantemente, realizou-se o fatiamento da peça extraída do útero em cortes longitudinais, seguido de cortes transversais, formando retalhos com medidas de 4 x 4 mm, em meio líquido com Ringer lactato, sendo transpassado ponto com fio de náilon 6-0 na superfície serosa do retalho e mantido reparado. O retalho foi autotransplantado para o mesentério, próximo ao vaso que irriga o ceco, mantendo-se a superfície serosa em contato com o mesentério e a superfície endometrial voltada para a luz da cavidade peritoneal. A fixação foi realizada com um ponto simples do retalho reparado acima.

A cavidade peritoneal ficou coberta com gaze embebida com solução fisiológica a 0,9% durante todo o procedimento. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura contínua acometendo o plano músculo-aponeurótico e a pele com fio de nylon 5-0. É importante destacar que, nenhuma suplementação hormonal foi administrada antes ou após a laparotomia.

Após a primeira operação, todos os animais foram observados por 21 dias no Biotério Setorial da Pós-Graduação, com protocolo analgésico pós-operatório com cloridrato

de tramadol na dose de (1mg para cada 100 gramas de peso) a cada oito horas por 24 horas, por gavagem.

#### 4.4.2 Confirmação do diagnóstico da endometriose (segunda cirurgia)

Após o período inicial, as ratas foram submetidas a uma laparotomia exploratória na cavidade peritoneal com identificação e medida do foco de autotransplante com paquímetro digital, seguido do cálculo do volume [ $4\pi$  (comprimento/2) x (largura/2) x (altura/2/3)]. Os implantes foram então classificados de acordo com o Sistema de Classificação dos Implantes em Grau de Crescimento (QUEREDA; BARROSO; ACIEN, 1996), e somente aquelas que desenvolveram grau de crescimento II, ou seja, com diâmetro >2mm, seguiram no estudo.

Quadro 1 – Classificação do crescimento dos implantes endometriais

| Grau de Crescimento | Características dos implantes                                                                                                  |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                   | O implante desaparece, ou se visível não se torna um cisto                                                                     |
| I                   | O implante forma uma vesícula cujo diâmetro principal é <2 mm ou, se maior, é sólido                                           |
| II                  | O implante forma um cisto com fluido, e seu diâmetro principal é >2 mm, mas < 4,5 mm (menor que o tamanho inicial do implante) |
| III                 | O diâmetro da vesícula é semelhante ou maior que o tamanho inicial do implante (> 4,5 mm)                                      |

Fonte: Quereda *et al.* (1996).

Após 48 horas da laparotomia e diagnóstico da endometriose, iniciou-se os tratamentos experimentais nos animais previamente selecionados, os quais foram divididos aleatoriamente em seis grupos:

- Grupo A: Sham (n: 06) grupo saudável;
- Grupo B: Controle (n: 06), realizado implante cirúrgico ectópico e tratado com placebo (SF 0,9%, no volume de 1 ml/100g de peso corpóreo do animal) diariamente, por 21 dias;
- Grupo C: realizado implante cirúrgico ectópico e tratado com talidomida (25 mg/kg) diluídos em 0,5mL de solução salina (n: 06), que foram administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;

- d) Grupo D: realizado implante cirúrgico ectópico e tratado com talidomida 50 mg/kg diluídos em 0,5mL de solução salina (n: 06), que foram administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;
- e) Grupo E: realizado implante cirúrgico ectópico e tratado com talidomida 100 mg/kg diluídos em 0,5mL de solução salina (n: 06), que foram administrados via oral (gavagem), diariamente, por 21 dias;
- f) Grupo F: realizado implante cirúrgico ectópico e tratado com acetato de leuprolida (1mg/kg), dose única subcutânea (n: 06).

A decisão pelas doses de 25mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg de talidomida, foi estabelecida a partir de estudos prévios de Azimirad *et al.* (2014) e Bakacak *et al.* (2015). A dose única de 1 mg/kg, por via subcutânea de acetato de leuprolida foi baseada em estudos de Cavkaytar *et al.* (2015) e Goktolga *et al.* (2015).

#### **4.5 Avaliação clínica da dor**

A avaliação clínica quanto à presença de sinal comportamental da dor foi realizada antes do início do tratamento (D0), assim como no 7º dia (D7), 14º dia (D14) e 21º dia (D21) de tratamento.

Para evitar vieses na pesquisa por falsos positivos nos testes comportamentais, através do manejo de rotina (limpeza), administração de medicamentos, manipulação do animal e condições ambientais (temperatura, ruídos e iluminação), todos os testes de avaliação da dor nociceptiva e espontânea no estudo foram feitos antes da gavagem nos animais fazendo com que o manejo para administrar a medicação e a solução salina não intervissem nas mesmas. Outra precaução foi manter a temperatura e iluminação da sala de avaliação semelhantes ao biotério setorial, assim como um ambiente silencioso, permanecendo na sala somente os três avaliadores para os testes comportamentais (MILLER; LEACH, 2016).

##### **4.5.1 Avaliação da dor espontânea**

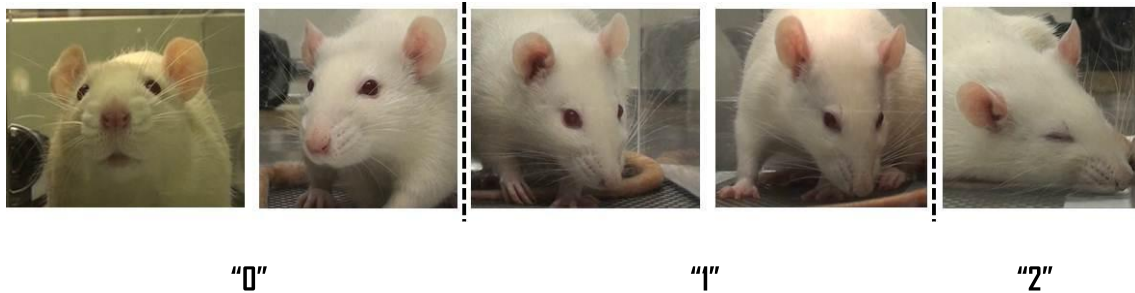
A identificação da dor pode ser baseada em vários indicadores, como fisiológicos, comportamentais ou físicos. Cada um deles foi usado para desenvolver diferentes sistemas de pontuação, com potenciais benefícios e limitações. Além de uma série de vantagens, as escalas de caretas estão provando ser uma metodologia útil que atende à maioria dos pré-requisitos para identificar e avaliar a dor em animais de pesquisa (COHEN; BETHS, 2020).

O método é relativamente simples e não requer nenhum equipamento especializado. O animal não precisa ser treinado e a análise pode ser realizada na própria gaiola, o que limita fatores de confusão. Finalmente, as escalas podem ser usadas para avaliar a dor espontânea e evocada. As regiões da face que se alteraram durante a expressão da dor incluem os olhos, nariz, bochecha, boca, orelha e bigodes podendo ser objetivamente pontuadas (DESCOVICH *et al.*, 2017; MCLENNAN, 2018; TAPPE-THEODOR; KING; MORGAN, 2019).

Para discriminar a sensação subjetiva de dor facial utilizando-se a escala de caretas em ratos (as) (*rat grimace scale*), adotou-se os seguintes critérios de avaliação (SOTOCINA *et al.*, 2011): dor ausente é igual a “0”, dor moderada é igual a “1” e dor intensa é igual a “2”, por meio da identificação das mudanças dos olhos, mudanças na protuberância do nariz/bochecha, mudanças nas orelhas e mudanças nos bigodes. O escore geral de dor facial foi dado pela média dos escores de três avaliadores, como descrito abaixo:

- a) Mudança dos olhos: Os ratos com dor exibem um estreitamento da área orbital, uma pálpebra firmemente fechada ou um aperto nos olhos. Como orientação, qualquer fechamento que reduza o tamanho do olho em mais da metade deve ser codificado como “2”, pela metade como “1” e olhos abertos “0”. Fotografias de ratos dormindo não devem ser tomadas e/ou codificadas;
- b) Mudanças na protuberância do nariz/bochecha: Os ratos com dor exibem uma falta de protuberância no topo do nariz (isto é, um achatamento do nariz). Na condição “sem dor”, uma protuberância clara está presente na ponte do nariz. As bochechas também são arredondadas e levemente estufadas. Quando existe dor, a ponta do nariz se achata e se alonga, fazendo com que as bochechas do bigode achatem;
- c) Mudanças nas orelhas: As orelhas dos ratos com dor tendem a dobrar, enrolar para dentro e são inclinadas para a frente. Em estados de dor acentuados, as orelhas são inclinadas para fora e são mantidas perto de 45° tanto do eixo perpendicular quanto do nariz. Como resultado, o espaço entre as orelhas pode parecer mais amplo em relação à linha de base (Figura 2);

Figura 2 – Avaliação subjetiva das mudanças nas orelhas pela MGS em ratos



Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora

- d) Mudanças nos bigodes: Os ratos com dor têm bigodes angulados para trás ao longo da cabeça. Na dor, o bigode é contraído, fazendo com que eles se agrupem e sejam direcionados para fora do rosto. Isso dá a aparência dos bigodes como “em pé”. Conforme os folículos se tornam tensos, os bigodes ficam mais próximos e são menos distintos.

#### 4.5.2 Teste de Von Frey: Avaliação da Alodinia Mecânica

Para avaliação do limiar de afastamento abdominal, foi utilizado o teste de Von Frey que utiliza um analgesímetro digital (Modelo Insight, São Paulo, Brasil), e consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à parede pélvica anterior dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este. Os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparentes, medindo 12 x 20 x 17cm, cuja plataforma consiste de uma rede de malha igual a 5mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, estes orifícios possuem tamanhos adequados apenas para o acesso da ponteira (Figura 6). Com o objetivo de adaptação ao ambiente, os animais foram colocados nas caixas, 15 minutos antes do início do teste. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de acrílico para facilitar a visualização da pelve dos animais. O avaliador que foi sempre o mesmo, aplicou por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente pelve até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como movimentação de defesa abdominal. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, até

que o animal apresentasse três medidas similares com uma clara resposta de movimentação (SILVA, 2009; KALFF; DOWSING; GRIGG, 2010).

#### 4.5.3 Avaliação de atividade motora/deambulação forçada (*RotaRod Test*)

Com o objetivo de avaliação da atividade motora os animais foram colocados em um aparelho de Rotarod (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 300 segundos.

A qualidade da deambulação forçada foi graduada em uma escala numérica adaptada que variou de 5 a 1, em que: 5 = uso normal dos membros; 4 = claudicação leve; 3 = claudicação grave; 2 = intermitente desuso dos membros; 1 = completo desuso dos membros (KALFF; DOWSING; GRIGG, 2010).

#### 4.6 Dosagem de citocinas

Nos dias D7 e D21, foram coletas amostras de sangue total de cada animal em tubos contendo anticoagulante EDTA-K3, pela punção da veia caudal das ratas e centrifugadas por quinze minutos a 3000 x g, promovendo a separação entre plasma e células sanguíneas. O plasma foi então armazenado em Eppendorfs® a – 20°C de temperatura, para posterior quantificação das citocinas TNF  $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 pelo método de imunoabsorção enzimática. Toda a técnica seguiu instruções dos kits de dosagem das respectivas citocinas (Quantikine® Elisa Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) e do equipamento.

#### 4.7 Eutanásia

Os animais de cada grupo foram anestesiados com associação de cloridrato de cloridrato de ketamina (150mg/Kg) e cloridrato de xilazina (15mg/Kg). Após perda dos reflexos motores e constatação de perda do reflexo de retirada da pata por pinçamento, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, e foi realizada uma incisão na linha mediana, abaixo do manúbrio do esterno, cranialmente a sínfise pélvica. A veia cava caudal foi dissecada, e a venopunção desta veia foi realizada para coleta de sangue terminal (média de 5ml) para posterior realização de análises hematológicas. As carcaças dos animais foram encaminhadas à incineração de acordo com o protocolo do Biotério Central da UFMA.

#### 4.8 Análise histopatológica

Os implantes endometriais da parede abdominal, colhidos no D21, foram fixados em formaldeído a 10% (v/v), com posterior desidratação e inclusão em blocos de parafina. A partir disso foram preparadas secções com 5µm de espessura e as mesmas coradas pela hematoxilina e eosina para análise histológica em microscopia óptica de campo claro. Foram então obtidas imagens utilizando câmera fotográfica acoplada ao microscópio (Biocam<sup>®</sup>), sendo as mesmas avaliadas por um único patologista.

De forma semiquantitativa, foi ainda avaliada a persistência de células epiteliais dos autotransplantes pós-tratamento, a partir da classificação histológica associada à escores definidos por Keenan *et al.*, em 1999, os quais, apesar do caráter subjetivo, são os mais utilizados para avaliar a endometriose experimental (Quadro 2), mostrando que quanto maior for o impacto na integridade e preservação da camada epitelial maior será o efeito na regressão dos implantes endometrióticos.

Quadro 2 – Escores de avaliação da persistência de células epiteliais em autotransplantes de endométrio

| Escore | Característica epitelial                                                 |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|
| 3      | Camada epitelial bem preservada                                          |
| 2      | Epitélio moderadamente preservado, com infiltrado leucocitário           |
| 1      | Epitélio pobremente preservado, com apenas células epiteliais ocasionais |
| 0      | Ausência de camada epitelial                                             |

Fonte: Keenan *et al.* (1999).

#### 4.9 Análise estatística

Os dados foram coletados a partir de uma ficha de avaliação, tabulados e comparados entre os grupos estudados. Utilizou-se o teste de *Shapiro-Wilk* para testar a normalidade das variáveis quantitativas.

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com a análise de variância univariada (*One-Way Analysis of Variance – one-way ANOVA*), seguida

pelo teste de *Tukey* de múltiplas comparações. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado análise de variância bivariada (*Two-way ANOVA*).

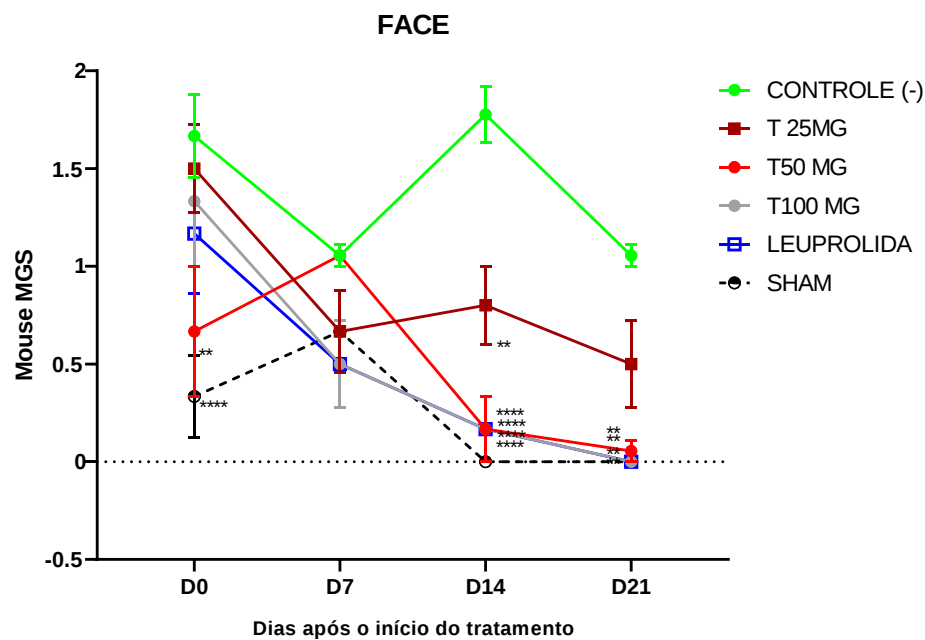
Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prism®, versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, Inc., CA, USA) e os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $P < 0.05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da dor espontânea

No D0, apenas o grupo T50 ( $p=0,0034$ ) obteve redução clinicamente significativa da dor quando comparado ao grupo controle, bem como o grupo *sham* ( $p<0,0001$ ). Já no D7 não foi observado melhora da dor nos grupos avaliados quando comparado ao controle. No D14 houve uma melhora similar entre os grupos farmacologicamente tratados em comparação ao controle, com diferença estatisticamente significativa entre as médias dos escores de dor dos grupos T25 ( $p=0,0081$ ), T50 ( $p<0,0001$ ), T100 ( $p<0,0001$ ), leuprolida ( $p<0,0001$ ) e Sham ( $p<0,0001$ ). Na comparação entre o grupo leuprolida e os demais grupos não houve diferença estatisticamente significativa (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Avaliação da dor espontânea pelo teste *Mouse Grimace Scale*



Nota: As linhas representam média com  $n = 6$  por grupo. Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/21dias de NaCl a 0,9%; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/21dias de Talidomida; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados, via subcutânea, de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. As linhas representam média  $\pm$  desvio padrão com  $n=6$  por grupo, nos momentos D0, D7, D14 e D21, e expressos em um escore que pode variar de 0 a 10. Os símbolos \*\*\*\* e \*\*\* representam diferenças significativas por grupos. A análise estatística foi realizada usando ANOVA Two Way ( $p=0,0007$ ) com o teste de Tukey como post hoc. Eixo X: Dias após indução; eixo Y: escore MGS.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

Na última avaliação, demonstrou-se uma resposta clínica efetiva nos grupos T50 ( $p= 0,0034$ ) T100 ( $p= 0,0016$ ), leuprolida ( $p= 0,0016$ ) e Sham ( $p= 0,0016$ ), com uma melhor resposta nos grupos T100 e leuprolida que conseguiram zerar a escala de dor ao final do protocolo.

## 5.2 Avaliação da alodínia mecânica

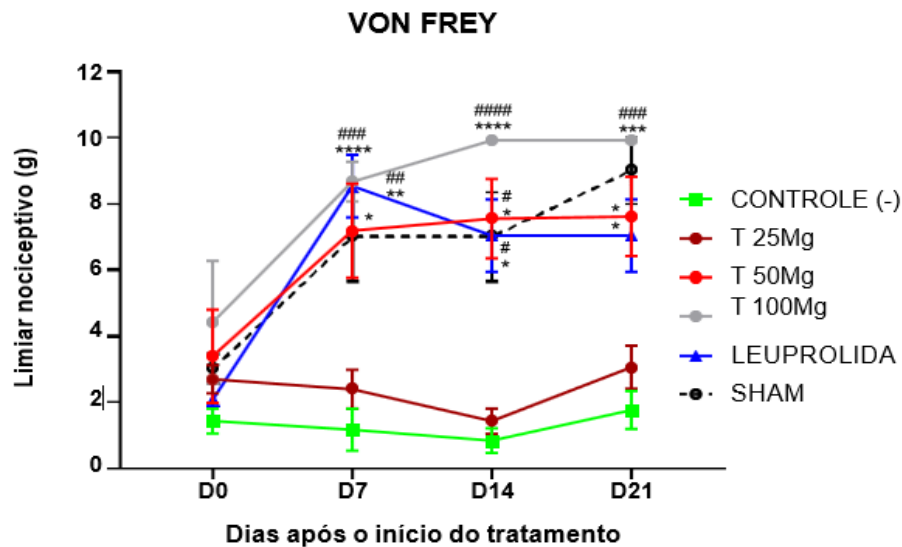
Este teste baseia-se na avaliação de tolerância das ratas a estimulações dolorosas, portanto, quanto maior o valor obtido durante o teste, melhor o efeito farmacológico. No dia 0 não houve diferença significativa entre os grupos tratados com talidomida quando comparados com o controle, leuprolida e sham.

A partir do sétimo dia, observou-se um aumento da tolerabilidade a dor dos grupos T50 ( $p= 0,0463$ ), T100 ( $p<0,0001$ ) e leuprolida ( $p= 0,0013$ ), comparado ao grupo controle e o grupo Sham ( $p= 0,0401$ ), com uma diferença mínima de 5,9 pontos nos escores de avaliação. Ressalta-se que o grupo T100 teve a maior tolerabilidade com diferença de 7,5 quando comparado ao controle.

Assim como na avaliação anterior, no 14º dia, observou-se ainda uma maior tolerabilidade ao comparar o grupo controle com o grupo T50 ( $p= 0,0131$ ), T100 ( $p<0,0001$ ) e leuprolida ( $p= 0,0120$ ), ratificando que a melhor resposta clinicamente significativa foi a dose de 100mg, apresentando uma diferença de 9,1 na estimulação algica dos animais testados. Observou-se que a tolerabilidade do grupo T50 e leuprolida são próximas, indicando uma diferença de 6 pontos se comparado ao grupo controle. Manteve-se a diferença estatística entre o grupo controle e o grupo Sham ( $p=0,0328$ ). Ainda nesse mesmo período, o T25 não obteve diferença nas médias quando comparado ao grupo controle, ou seja, sua resposta não foi clinicamente significativa, resultado confirmado na comparação com o grupo leuprolida, apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0198$ ).

No último dia de aplicação do protocolo os grupos T 50 ( $p= 0,0231$ ), T 100 ( $p=0,0002$ ) e leuprolida ( $p=0,0252$ ) mantiveram sua resposta clínica de tolerabilidade a dor, resultando em uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle, com no mínimo 5,2 pontos acima no escore de avaliação (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Avaliação da alodinia mecânica utilizando o do teste VonFrey



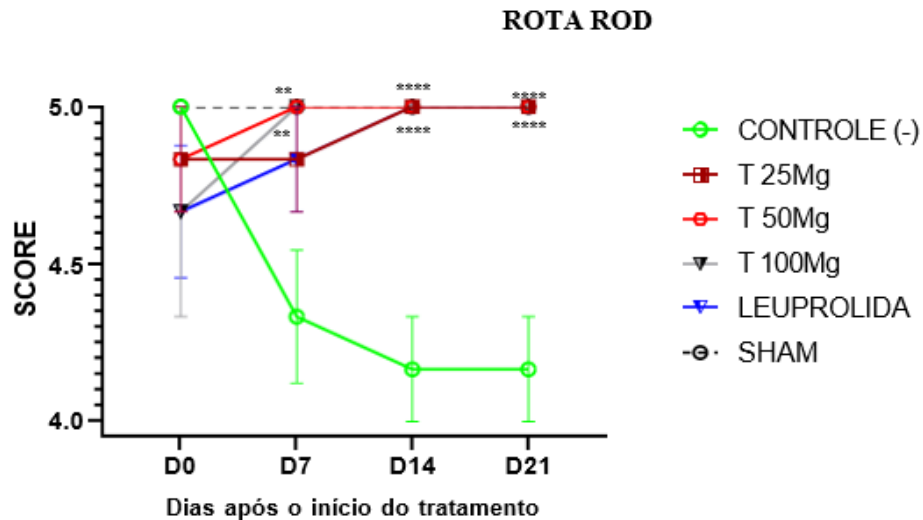
Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. As linhas representam média  $\pm$  desvio padrão com  $n=6$  por grupo, nos momentos D0, D7, D14 e D21, e expressos em um escore que pode variar de 0,05 a 300 gramas (g) de força. Os símbolos ##### e \*\*\* representam diferenças significativas por grupos. A análise estatística foi realizada usando ANOVA Two Way ( $p=0,0065$ ) com o teste de Tukey como post hoc. Eixo X: Dias após indução; eixo Y: limiar nociceptivo de afastamento abdominal.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

### 5.3 Avaliação da atividade motora / deambulação forçada

A avaliação por meio do teste Rota Rod considera a da limitação da marcha das ratas ao estímulo de dor provocado pela endometriose, avaliadas nos dias 0, 7, 14 e 21 do estudo. No dia 0 não houve diferença significativa entre os grupos estudados quando comparado com o controle e o leuprolida.

Identificou-se no D7 a preservação da marcha nos grupos T50, T100 e Sham ( $p < 0,0031$ ) em comparação ao controle, que apresentou claudicação leve logo nessa primeira avaliação. Os grupos que foram submetidos aos tratamentos farmacológicos ( $p < 0,0001$ ) e o grupo sham ( $p=0,002$ ) mantiveram o ritmo de marcha normal ou muito próximo ao normal em continuidade no D14 ( $p < 0,0001$ ) bem como no D 21 ( $p < 0,0001$ ), demonstrando efetividade do tratamento frente ao grupo controle que manteve – se em claudicação leve até o final da avaliação do protocolo.

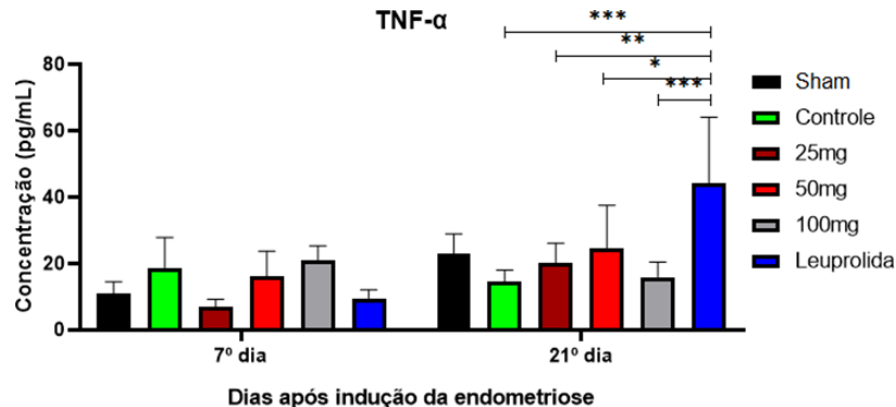
Gráfico 3 – Avaliação da atividade motora/deambulação forçada usando o *rotarod teste*

Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de formaterapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. As linhas representam média  $\pm$  desvio padrão com n=6 por grupo, nos momentos D0, D7, D14 e D21, e expressos em um escore que pode variar de 1 a 5. Os símbolos #### e \*\*\* representam diferenças significativas por grupos. A análise estatística foi realizada usando ANOVA *Two-Way* ( $p=0,0006$ ) com o teste de *Tukey* como post hoc Eixo X: Dias após indução; eixo Y: limiar nociceptivo de afastamento abdominal.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

#### 5.4 Determinação da concentração do TNF $\alpha$

No D7 os níveis de TNF- $\alpha$  foram baixos em todos os grupos sem alcançar diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto no D21 onde o grupo leuprolida demonstrou ter nível superior desta citocina após 21 dias da administração do fármaco. Essa diferença foi estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos, com valores respectivamente, sham ( $p=0,0120$ ), T25 ( $p=0,0031$ ), T50( $p=0,0235$ ), T100 ( $p=0,0004$ ) e controle ( $p=0,0002$ ) (Gráfico 4).

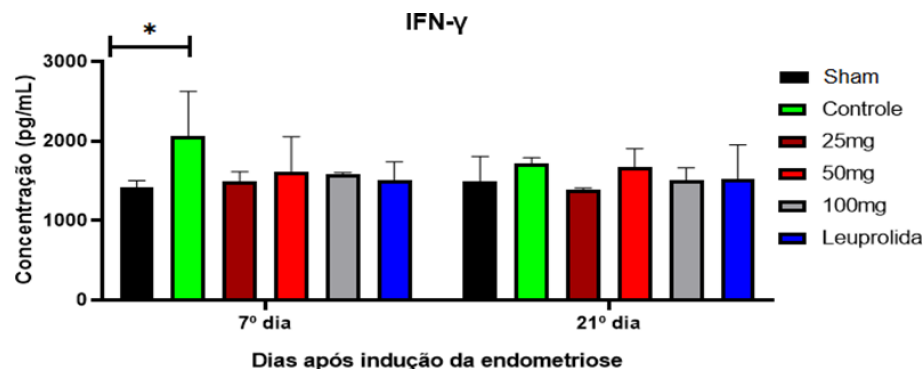
Gráfico 4 – Avaliação da concentração de TNF  $\alpha$  em 2 momentos, D7 e D21

Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. O símbolo\*\*\* representa diferenças significativas por grupos. A análise estatística foi realizada usando ANOVA Two Way ( $p=0,0004$ ) com o teste de Tukey como post hoc. Eixo X: Dias após indução; eixo Y: concentração de TNF  $\alpha$  expressa em pg/mL.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

### 5.5 Determinação da concentração do INF $\gamma$

Ao avaliar os níveis de INF  $\gamma$  no D7 houve um aumento no grupo do grupo controle, quando comparado ao sham, com diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0262$ ). Todos os demais grupos quando comparados ao controle ou leuprolida tanto no D7 quanto no D21, não obtiveram diferença estatisticamente significativa (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Avaliação da concentração de INF  $\gamma$  em 2 momentos, D7 e D21

Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não

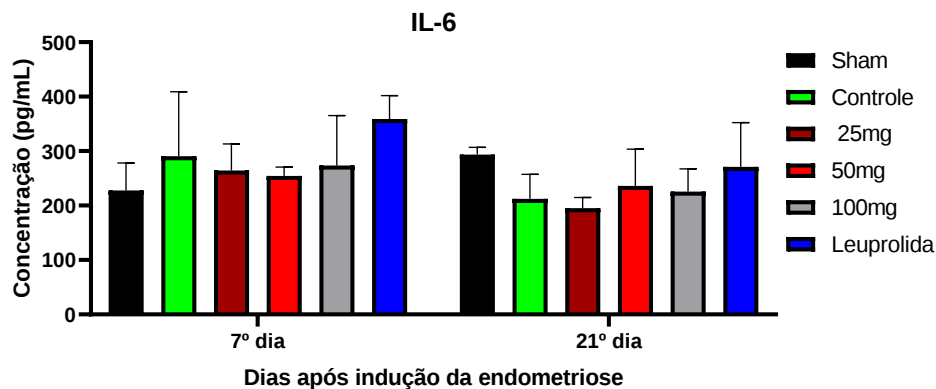
tratados. Os resultados obtidos são representados em média  $\pm$  desvio padrão nos momentos D7 e D21. O símbolo\* representa diferenças significativas por grupos. A análise estatística foi realizada usando ANOVA Two Way ( $p=0,6693$ ) com o teste de *Tukey* como post hoc. Eixo X: Dias após indução; eixo Y: concentração de INF  $\gamma$  expressa em pg/mL

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

## 5.6 Determinação da concentração de IL-6

No D7 e no D21 níveis de IL-6 não se mostraram diferentes estatisticamente quando comparado o controle com os demais grupos. Damesma forma não se observou diferença entre as médias de IL6 quando comparado o grupo leuprolida com os demais grupos (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Avaliação da concentração de IL-6 em 2 momentos, D7 e D21



Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. Os resultados obtidos são representados em média  $\pm$  desvio padrão nos momentos D7 e D21. A análise estatística foi realizada usando ANOVA Two-Way ( $p=0,02904$ ) com o teste de *Tukey* como post hoc. Eixo X: Dias após indução; eixo Y: concentração de IL-6 expressa em pg/mL.

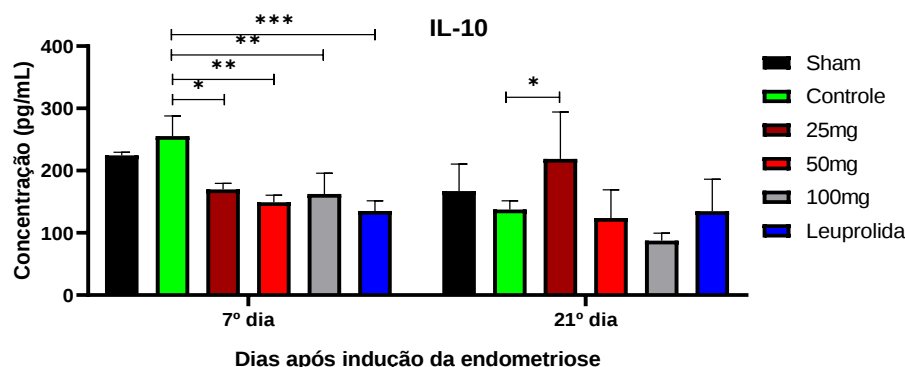
Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

## 5.7 Determinação da concentração de IL-10

Observa-se no D7 níveis elevados de IL-10 com diferença estatisticamente significante quando comparado com os grupos T25 ( $p=0,0135$ ), T50 ( $p=0,0020$ ), T100 ( $p=0,0091$ ) e leuprolida ( $p=0,0004$ ).

No D21 identificou-se redução dos níveis de IL-10 em todos os grupos exceto, no grupo T25 ( $p=0,0302$ ) com diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle. Não se observou diferença entre os demais grupos e o controle (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Avaliação da concentração de IL-10 em 2 momentos, D7 e D21



Nota: Grupos: CONTROLE (-): animais com endometriose induzida e tratados via oral com 1mL/Kg/dia de NaCl 0,9% do D1 ao D21; T25: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 25mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T50: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 50mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; T100: animais induzidos e tratados via oral de forma terapêutica com 100mg/Kg/dia de Talidomida do D1 ao D21; LEUPROLIDA: animais induzidos e tratados via subcutânea de forma terapêutica com 1mg/kg em dose única no D1; SHAM: animais não induzidos e não tratados. Os resultados obtidos são representados em média  $\pm$  desvio padrão nos momentos D7 e D21. Os símbolos #### e \*\*\* representam diferenças significativas por grupo. A análise estatística foi realizada usando Two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações ( $p = 0,0008$ ) Eixo X: Dias após indução; eixo Y: concentração de IL-10 expressa em pg/mL.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

## 5.8 Análise volumétrica dos implantes

Não foi identificado diferença estatística significativa na comparação entre média inicial e final do grupo controle ( $p = 0,600$ ), porém houve um aumento volumétrico dos implantes nas médias após 21 de aplicação do protocolo (diferença entre médias:  $7,86 \text{ mm}^3$ ). Ao contrário do grupo controle, observou-se uma redução dos implantes ao comparar as médias inicial e final dos grupos T50 (diferença entre as médias:  $111,01 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,14$ ), T100 (diferença entre as médias:  $188,22 \text{ mm}^3$ ;  $p = 0,017$ ), e leuprolida (diferença entre as médias:  $117,70 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 – Comparação do volume dos focos endometrióticos, inicial e após 21 dias de tratamento

|              | Volume inicial<br>(Média $\text{m}^3$ ) $\pm$ DP | Volume final<br>(Média $\text{m}^3$ ) $\pm$ DP | P      |
|--------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------|
| Controle (-) | 113,35 $\pm$ 36,76                               | 121,21 $\pm$ 19,25                             | 0,600  |
| T25mg        | 99,56 $\pm$ 73,61                                | 50,35 $\pm$ 68,01                              | 0,078  |
| T50mg        | 157,73 $\pm$ 102,20                              | 5,79 $\pm$ 6,66                                | 0,014  |
| T100mg       | 193,45 $\pm$ 129,22                              | 5,22 $\pm$ 5,59                                | 0,017  |
| Leuprolida   | 122,03 $\pm$ 29,82                               | 4,32 $\pm$ 4,30                                | <0,001 |

Nota: Nesta tabela foram realizadas comparações intragrupos avaliando a média do volume inicial e final das lesões, através do Teste t pareado, considerando a rejeição de  $H_0$  quando  $p < 0,05$ .

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

### 5.9 Avaliação histológica

Durante a avaliação histológica, observou-se que os grupos com talidomida nas doses de 50mg, 100mg e leuprolida ( $p = 0,013$ ) obtiveram a menor preservação do epitélio ectópico indicando redução do implante endometriótico, sendo que T50 e T100 foi igual ao grupo leuprolida (Tabela 2).

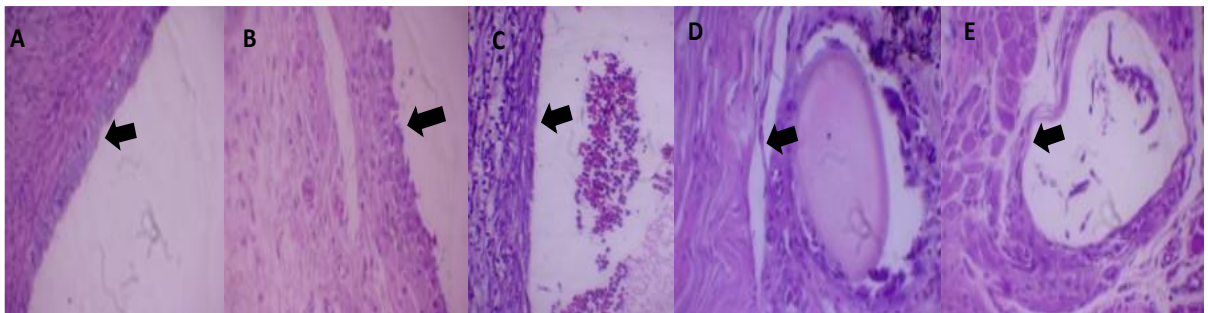
Tabela 2 – Avaliação da histologia por meio da escala de KEENAN

|                     | SCORE do teste<br>Média $\pm$ DP  | P            |
|---------------------|-----------------------------------|--------------|
| <b>Controle (-)</b> | <b>2,75 <math>\pm</math> 0,50</b> |              |
| <b>T25mg</b>        | <b>1,50 <math>\pm</math> 0,58</b> |              |
| <b>T50mg</b>        | <b>0,75 <math>\pm</math> 0,50</b> | <b>0,013</b> |
| <b>T100mg</b>       | <b>0,75 <math>\pm</math> 0,50</b> |              |
| <b>Leuprolida</b>   | <b>0,75 <math>\pm</math> 0,50</b> |              |

Nota: Nesta tabela foram realizadas comparações entre grupos relacionando o valor do score da escala de KEENAN através do Teste de Friedman, considerando a rejeição de  $H_0$  quando  $p < 0,05$ .

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

Figura 3 – Fotomicrografias dos epitélios endometrióticos (setas)



Nota: **A** epitélio bem preservado, com citoplasmas bem desenvolvidos, referente ao grupo CONTROLE (-); **B**: epitélio moderadamente preservado do grupo T25, com citoplasmas pouco desenvolvidos; **C, D e E**: epitélio pobremente preservado referente aos grupos T50, T100 e LEUPROLIDA respectivamente, com células ocasionais de citoplasma pouco desenvolvido. (A), (B) e (C) 5 $\mu$ m, 40x, HE.

Fonte: Dados da pesquisa realizada pela autora.

## 5.10 Artigo 1

Artigo aprovado para publicação no periódico Veterinary World – Open Access and Peer Reviewed Journal (ANEXO B).

### **RECENT ADVANCES IN THE TREATMENT OF PAIN IN ENDOMETRIOSIS: a bibliometric analysis in experimental models**

#### **Treatment of pain in endometriosis: a bibliometric analysis**

RA Lima<sup>1</sup>, IBJ Souza<sup>1</sup>, GM Frota<sup>2</sup>, TCMM Prazeres<sup>2</sup>, SBJ Souza<sup>3</sup>, EM Sousa<sup>4</sup>, MSS Cartágenes<sup>4</sup>, RC Carvalho<sup>4</sup>, ASP Ferreira<sup>4</sup> e JBG Santos<sup>4</sup>.

- 1- Doutorando(a) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, Brasil.
- 2- Doutorando(a) em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Maranhão, Brasil.
- 3- Médica da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís-MA, Brasil.
- 4- Professor (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, Brasil

#### **AUTOR CORRESPONDENTE:**

Rafael de Abreu Lima<sup>1</sup>

Universidade Federal do Maranhão, Prédio da Pós-Graduação do Programa de Ciências da Saúde - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Avenida dos Portugueses, nº 1966, Vila Bacanga CEP 65080-805; Fone: (98) 99131-6153. E-mail: [rafael.al@ufma.br](mailto:rafael.al@ufma.br)

**Keywords:** Endometriosis; Animal model; Rats; Treatments; Pain

## **Bibliometric analysis of the treatment of pain in endometriosis.**

### **Abstract**

Treatment of endometriosis involves pain relief. Achieved through the administration of analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, with or without the addition of hormone therapy. However, studies investigating the treatment of pain in endometriosis using experimental models in rats and the utilization of medications are limited. Therefore, a bibliometric analysis was conducted to systematically evaluate research trends and critical points in the field of endometriosis pain treatment in experimental models. Thirty publications related to this theme, spanning from 2012 to 2022, were retrieved from various databases including Web of Science, Scopus, PubMed, Embase, and CINAHL, using appropriate keywords in the English language. The quality of the publications was evaluated using impact metrics, productivity, term density mapping, and author network. The average annual publication rate was found to be 3 articles per year, with a peak in 2021 at 5 articles. The United States and China emerged as the most productive countries, with 12 and 10 publications, respectively. The field of Medicine (37.0%) was the most prolific, although the H-index was relatively low (13:13). Term density mapping involved the investigation of 542 keywords, from which 35 were selected, with only 8 displaying significant density. In conclusion, there is a paucity of publications addressing this theme over the past decade. The dominance of the United States and China in production and publication on this subject is evident, along with limited exchange of knowledge, and technologies in this field. Being necessary for international cooperation and funding to foster novel approaches for treating pain in endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis; Animal model; Rats; Treatments; Pain

### **1. Introduction**

Endometriosis is a chronic, inflammatory, benign, and estrogen-dependent gynecological disease characterized by the aberrant growth of endometrial-like tissue outside the uterine cavity. It affects approximately 10% of women in their reproductive years and is associated with 50% of infertility cases<sup>1-2</sup>. Due to its multifactorial etiology, chronic pelvic pain occurs in more than 70% of cases, often accompanied by debilitating dyspareunia, dysmenorrhea, and other symptoms, significantly impairing women's daily activities and negatively impacting their overall quality of life. The diagnosis of endometriosis is time-consuming, and conventional drug treatments are costly and often exhibit limited efficacy, with potential for relapse and complications upon treatment cessation<sup>3-4</sup>.

Therefore, regardless of the therapeutic approach employed, it is crucial to pursue a treatment strategy that aligns with the individual patient's characteristics and ensures easy therapeutic adherence<sup>5</sup>. In this regard, animal models have been extensively utilized in experimental studies focused on endometriosis, aiming to enhance our understanding of its pathogenesis, disease progression, and potential treatment modalities<sup>6</sup>. However, the existing knowledge in this area is still insufficient to provide conclusive guidance, particularly regarding the currently proposed treatments<sup>7</sup>. Numerous gaps remain to be elucidated, especially in studies investigating the treatment of endometriosis pain using experimental rat models and exploring the use of non-conventional medications.

To address these knowledge gaps, a bibliometric analysis is proposed, as it represents a well-established method for evaluating research trends through quantitative and qualitative measures. By employing bibliometric indicators such as the temporal distribution of studies, the number of authors, publications, countries, scientific collaborations, journals, and impact factors, this analysis aims to provide comprehensive insights into the progress of scientific research and technological advancements in the field<sup>8-9</sup>.

Despite the continuous growth in the number of annual publications, a comprehensive bibliometric analysis focusing on this specific area has yet to be conducted. Thus, there is a clear need for this bibliometric review, aiming to systematically assess research trends and critical aspects related to the treatment of endometriosis pain in experimental rat models. The primary objective of this analysis is to systematically evaluate research trends and critical points in the field of endometriosis pain treatment in experimental models in rats, proposing a new paradigm for future research.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Data sources and search strategy**

The data were collected independently by pairs during the period of January to February 2023. The specific topic of interest was the treatment of endometriosis pain in experimental rat models, focusing on articles published in indexed journals from January 2012 to December 2022. To retrieve relevant data, multiple databases including Scopus, Web of Science (WOS), CINAHL, Embase, WHO, and PubMed were utilized.

Web of Science, owned by Clarivate, and Scopus, owned by Elsevier, are widely recognized sources of citation data that are curated by subscribing institutions. The combination of these two databases, Web of Science and Scopus, encompasses a broader range of scientific disciplines, encompasses a wider span of publication dates, includes a larger number of countries, and offers comprehensive citation analysis. Due to these advantages, these databases are commonly employed in bibliometric analyses<sup>9-10</sup>.

A comprehensive search strategy was employed to ensure the inclusion of all relevant publications. The keywords used in the search were: [(endometriosis) OR (endometriose)] AND [(animal model) OR (animal models) OR (animal model experimental) OR (animal models experimental) OR (animal model laboratory)] AND [(rats) OR (rattus) OR (laboratory rats)] AND [(treatments) OR (management)] AND [(pain) OR (management pain)]. Additionally, the search was restricted to experimental studies conducted in the English language.

To refine the search results, several exclusion criteria were applied. Duplicate publications, dissertations, letters, book chapters, conference proceedings, and articles unrelated to the topic or lacking information on endometriosis pain outcomes were excluded. Any disagreements regarding inconsistent content were discussed and resolved. Furthermore, articles that could not be adequately assessed for inclusion based on their title alone were also excluded<sup>11</sup>. The citation information for all included articles was extracted from the Scopus database, ensuring a comprehensive collection of relevant data.

The quality of publications was evaluated using various bibliometric indicators. These included the total citation frequency, average citations per item, H-index, CiteScore, SCImago Journal Rank (SJR), and normalized source impact per article.

(SNIP). To analyze the quantity and publication trends, several factors were considered. These included the total number of publications, types of research conducted, research organizations involved, author contributions, journals of publication, and financial support received. Finally, specific information such as the number of publications, citations received, H-index values, journals of publication, references, and keywords were extracted and recorded as bibliometric indicators.

## **2.2 Bibliometric analysis**

This study employed a quantitative descriptive analysis methodology based on bibliometric analysis. The data generated from the analysis were presented using graphs and tables, which presented the results in both absolute numbers and percentages.

To conduct bibliometric mapping and cluster analysis, the VOSviewer® software version 1.6.15 (Leiden University, Netherlands) was utilized. VOSviewer® is a specialized software tool designed for constructing and visualizing bibliometric networks. By employing bibliometric mapping techniques, the software enables the visualization of academic production in terms of publications and citation information within a specific field. Additionally, cluster analysis algorithms were employed to identify natural divisions, or clusters, within research networks based on similarities. This facilitated the visualization of co-authorship networks among researchers, institutions, and countries (12).

## **2.3 Ethical considerations**

Since this study involved the analysis of existing published research, it did not require ethical approval. The data used were publicly available and did not involve any direct interaction with human subjects or their personal information. Additionally, no authors were contacted for additional information about their publications, as the analysis focused solely on the existing data within the publications themselves.

## **3. Results**

### **3.1. Pain management in endometriosis: Publications, authors, affiliations, countries, and grants**

A total of 142 publications were initially identified through searches in the databases, with 59 located in Scopus and 83 in the Web of Science. Following the application of refinement criteria, including a temporal filter (spanning from 2012 to 2022), document type (articles), and language (English), a final set of 30 studies was obtained. Out of these, 30 were sourced from Scopus and 10 from the Web of Science. After excluding 10 duplicate studies, 30 unique studies were included for the subsequent bibliometric data analysis<sup>13-42</sup>.

Table 1 provides an overview of the 30 included publications in this review. The majority of these publications originated from China (10 publications), followed by the United States (9 publications), Turkey (3 publications), and the United Kingdom (2 publications). Additionally, there were individual contributions from countries such as Italy, Brazil, Puerto Rico, India, Russia, and Iran, each with one publication.

**Table 1:** Experimental studies on pain treatment in endometriosis: publications in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023

Figure 1 illustrates the publication trends over the years, revealing a generally low number of publications in most years. Notably, there was no publication identified in

2013, while the highest peak of 5 publications was observed in 2021. On average, approximately 3 publications per year were published in the last decade.

**Figure 1:** Annual publication trends in pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023.

Fifteen countries were identified in the author affiliations section of the publications included in this review. The United States demonstrated the highest number of affiliations, with 12 publications, followed by China with 10 publications. Germany and Turkey each had 3 publications, as depicted in Figure 2.

**Figure 2:** Country-wise distribution of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023.

In terms of the areas that exhibited the highest publication output, 10 distinct fields were identified, with notable prominence in the following categories: Medicine (37.0%, 20 publications), Biochemistry, Genetics, and Molecular Biology (18.5%, 10 publications), Pharmacy, Pharmacology, and Toxicology (13.0%, 7 publications), and Neuroscience (11.1%, 6 publications), as depicted in Figure 3.

**Figure 3:** Subject area distribution of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023

### 3.2. Citations and index analysis

Table 2 presents the number of citations per year for each publication and the cumulative citations for the top 5 publications from 2012 to 2022, totaling 402 citations. Furthermore, we highlight the most cited journals along with their respective indicators: American Journal of Pathology (80 citations, CiteScore 8.6 / SJR 1.619 / SNIP 1.227), Journal of Visualized Experiments (44 citations, CiteScore 2.5 / SJR 0.504 / SNIP 0.449), Frontiers in Pharmacology (38 citations, CiteScore 6.6 / SJR 1.143 / SNIP 1.388), Reproductive Sciences (25 citations, CiteScore 4.2 / SJR 0.642 / SNIP 0.770), and Pain (25 citations, CiteScore 10.6 / SJR 2.135 / SNIP 2.172).

**Table 2:** Citations of the top 5 publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023

Figure 4 displays the CiteScore (A), SJR (B), and SNIP (C) graphs, comparing citation and impact factor related to endometriosis, rats, treatment, and pain. The figure demonstrates that the journals "Pain" and "Frontiers in Pharmacology" consistently obtained the highest scores and metrics over the years (Figure 4).

**Figure 4:** Indicators of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023. (A) CiteScore, (B) SJR, and (C) SNIP.

CiteScore is a straightforward way to measure the impact of citation sources, such as journals. It is based on the number of citations received by documents published in a journal over a four-year period, divided by the number of indexed documents of the same type in the Scopus database published in those same four years. The SCImago Journal Rank (SJR) graph represents the average weighted citations received in the selected year by documents published in the selected journal in the previous three years.

The Source Normalized Impact per Paper (SNIP) graph provides a corrective metric to account for differences in citation potential across different fields.

The graph below depicts a 45-degree line, which represents a 1:1 relationship between publishing and being cited. It emphasizes that out of the 30 documents considered for the h-index, 13 have been cited at least 13 times (Figure 5). In an overview of the selected documents, there is a trend of increasing citations for publications from 2016 (16 citations), 2017 (31 citations), 2018 (43 citations), 2019 (50 citations), 2020 (67 citations), 2021 (75 citations), and 2022 (96 citations) (Figure 6).

**Figure 5:** H-index of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023

**Figure 6:** Citations of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023

### 3.3 Co-occurrence and keyword density analysis

The network of co-occurring keywords (A) and the density of words or "hotspots" (B) were analyzed to clarify the relationship between the most cited references, co-occurring keywords, clusters, and bursts, with a focus on the treatment of pain in endometriosis using experimental models in rats. A total of 542 terms were mapped, and the selection criterion required a minimum occurrence of 5 times in the publications, resulting in 35 words. Among these, 8 keywords stood out: "animal experiment", "animal model", "article", "controlled study", "endometriosis", "female", "non-human", and "rat" (Figure 7).

The visualization of the co-occurrence analysis of keywords presents colored circles that indicate the frequency of occurrence of these words. The lines connecting the nodes represent their co-occurrence in the same publication, with shorter distances indicating a higher occurrence of the two keywords. The hotspots are represented by the intensity and size of the colored circles, with intense yellow indicating significant importance.

**Figure 7:** (A) Co-occurrence network of keywords and (B) Word density visualization in publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023

### 3.4. Group analysis of authors and most cited authors

In the analysis of authors and co-authors, we identified 135 names and 3 potential author groups. By examining the strength of connections among these 135 names, we found that the largest connected cluster consists of 8 names, highlighted in red (A). Furthermore, regarding the most cited and frequently co-published authors, three names (Levine, JD; Alvarez, P.; and Giudice, LC) were present in studies 16-18, indicating academic collaboration (B) (Figure 8).

**Figure 8:** (A) Visualization of groups of authors, and (B) Visualization of the most cited authors in publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023

## 4 Discussion

The present bibliometric review study provided a comprehensive overview of the literature on pain treatment in endometriosis in experimental rat models over the past

decade. By analyzing the available publications, we visualized the most recent and globally relevant academic contributions in this field. Our analysis revealed a limited number of publications in indexed databases, with a total of 142 articles identified. This translates to an average of only 3 articles per year during the 10-year period, with a peak of 5 publications observed in 2021. This scarcity of publications may be attributed to the complex etiopathogenesis of endometriosis and the challenges associated with its treatment. Additionally, it could indicate a need for increased investment and financial collaboration from advanced research centers to foster further research in this area<sup>4-5,13</sup>. Clearly, there is a pressing need for more extensive studies focusing on pain management in endometriosis.

Furthermore, notable disparities exist in the geographical distribution of published studies, with the United States and China emerging as the leading contributors in terms of research output, technical-scientific advancements, and financial collaborations<sup>43</sup>. In contrast, countries in Latin America, Africa, and Oceania exhibit a notable gap in this field. This discrepancy may be attributed to the unfavorable socioeconomic profiles of these developing countries, coupled with limited access to healthcare services. Moreover, the average diagnostic delay of seven years for endometriosis in these regions and inadequate investment in medical education<sup>44-45</sup> could further contribute to the scarcity of research publications.

It is important to acknowledge the substantial differences between countries like the United States and Brazil regarding technical cooperation and funding from institutes and universities. Developed countries often benefit from extensive collaborations and financial support in various research areas. This not only promotes technical-scientific advancements but also generates a greater interest in publishing in high-impact journals. In contrast, developing countries are frequently underrepresented in leading medical journals<sup>45-46</sup>.

Regarding the most prominent articles identified in this review, it is noteworthy that five of them received the highest number of citations, ranging from 80 to 25 citations. While categorized within the field of medicine, these publications did not achieve significant international and multidisciplinary visibility. This finding aligns with other bibliometric reviews that have also highlighted the challenges associated with pain-related research<sup>11,46-47</sup>.

One intriguing aspect among the analyzed articles is the strong association between the terms "endometriosis" and "pain." Pain represents the most prominent and defining manifestation of the disease, often causing significant discomfort and disability. Paradoxically, there remains a lack of studies focused on advancing our understanding of endometriosis treatment. Currently, the effectiveness of treatments is primarily assessed based on pain improvement or control and fertility rates, aiming to enhance the overall quality of life for affected women<sup>49</sup>.

Another notable finding of this bibliometric review is the limited impact of the publications, as evidenced by the h-index. However, when considering other citation metrics and impact scores such as CiteScore, SJR, and SNIP, it becomes apparent that they primarily target specific aspects of endometriosis and pain research. Interestingly, the most significant publications were predominantly found in journals dedicated to the medical field of gynecology and obstetrics. Among the five key articles, only one was published in a specialized pain journal. Several factors and barriers contribute to this low impact of publications.

Firstly, many journals tend to prioritize specific, innovative, and contemporary topics, which may result in overlooking studies on pain management in endometriosis that may not align with the latest trends. Secondly, the quality of publications plays a crucial role in determining their reach and acceptance in specialized and high-impact journals. Publications that do not meet the required standards may struggle to gain visibility in prominent outlets. Moreover, there appears to be a lack of sufficient incentives for research in this specific field, which hinders the overall progress and recognition of studies.

Another significant aspect influencing publication impact is the need for greater financial and technological investment. These resources are instrumental in conducting high-quality studies, particularly in developing countries. Unfortunately, limited financial support and access to advanced technologies often impede the execution of rigorous research, thereby impacting the quality and impact of publications. It is worth noting that the impact factor of a journal does not necessarily reflect the intrinsic quality of an individual article<sup>11-46</sup>. Furthermore, research resources are often directed towards the development of high-cost technologies and treatments. As a result, the implementation of study results in low-income countries becomes challenging, as they lack the necessary resources to adopt these advancements<sup>50</sup>.

During the analysis of word density, a notable absence of the term "treatment" is observed, both in the abstracts and titles of the publications. However, it is important to highlight that the term "treatment" played a crucial role in guiding and shaping this review. The choice of appropriate terms that accurately reflect the research objectives is of utmost importance as they provide a clear direction for readers and ensure the effectiveness of search strategies employed in databases<sup>50</sup>.

In the two author network mappings conducted, distinct patterns were observed. Firstly, a larger network consisting of Chinese researchers primarily affiliated with the same institution or specific region was identified. This network exhibited branching into smaller groups; however, it was characterized by the presence of key researchers in each group, thereby consolidating the number of research groups. In contrast, the other network comprised North American authors, which exhibited a smaller number of authors but a higher number of citations in the field of pain. This observation could potentially be attributed to regional isolation among researchers, limited exchange opportunities, and a lack of inter-institutional support<sup>50</sup>.

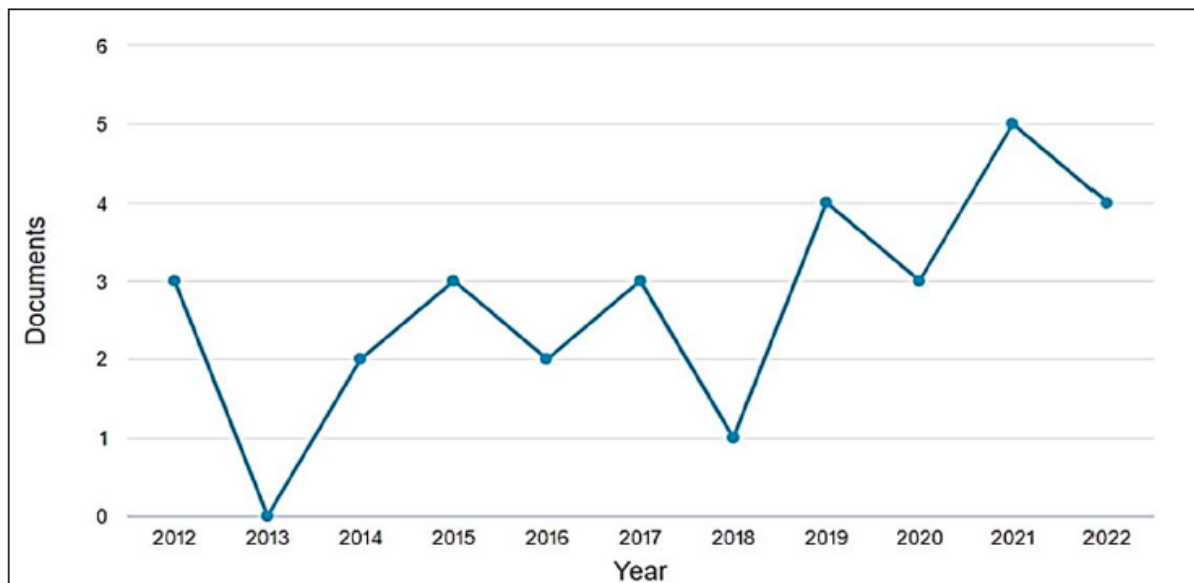
Notably, the maps did not include references to influential researchers from countries such as Germany and the United Kingdom. This absence can be attributed to the low production of research on the subject in these countries, as it is not uncommon for bibliometric reviews to observe such trends<sup>14,50</sup>.

This study was subject to certain limitations, including a limited number of references available for data comparison, the focus solely on studies conducted in rats, and the restriction to publications in the English language. Consequently, it is evident that there is a scarcity of research on pain management in endometriosis specifically in experimental rat models. To address this issue, it is imperative to promote further research across various fields of knowledge, encouraging funding and international collaboration. Only through these means we can establish a robust foundation of information and generate more substantial findings regarding effective treatments for controlling this type of pain. It is crucial to address this research gap, as endometriosis profoundly impacts the quality of life of affected women.

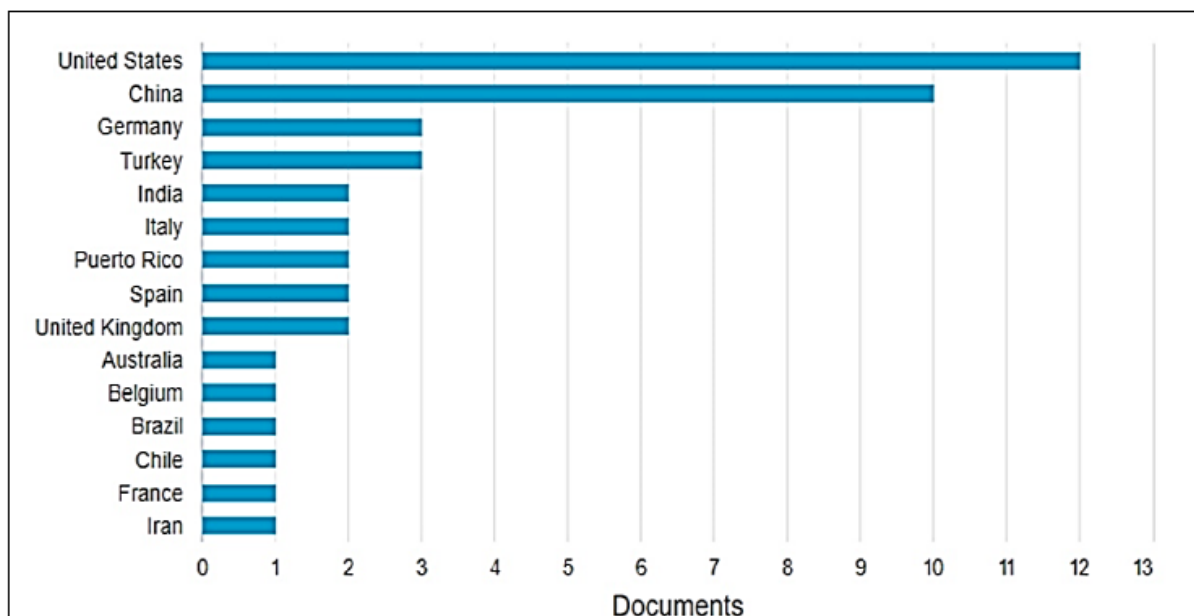
## Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMA (Foundation for the Support of Research and Scientific and Technological Development of the State of Maranhão),

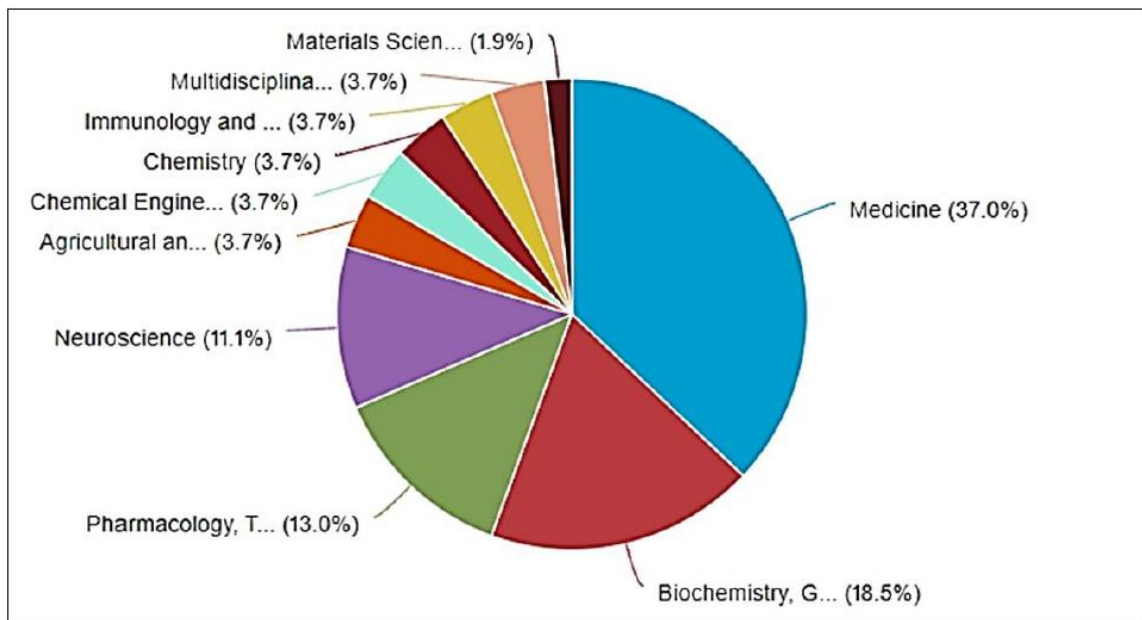
CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel; CEPEC-HUUFMA (Center for Clinical Research at the University Hospital of the Federal University of Maranhão) and LEED-UFMA (Experimental Laboratory of Pain Studies at the Federal University of Maranhão)



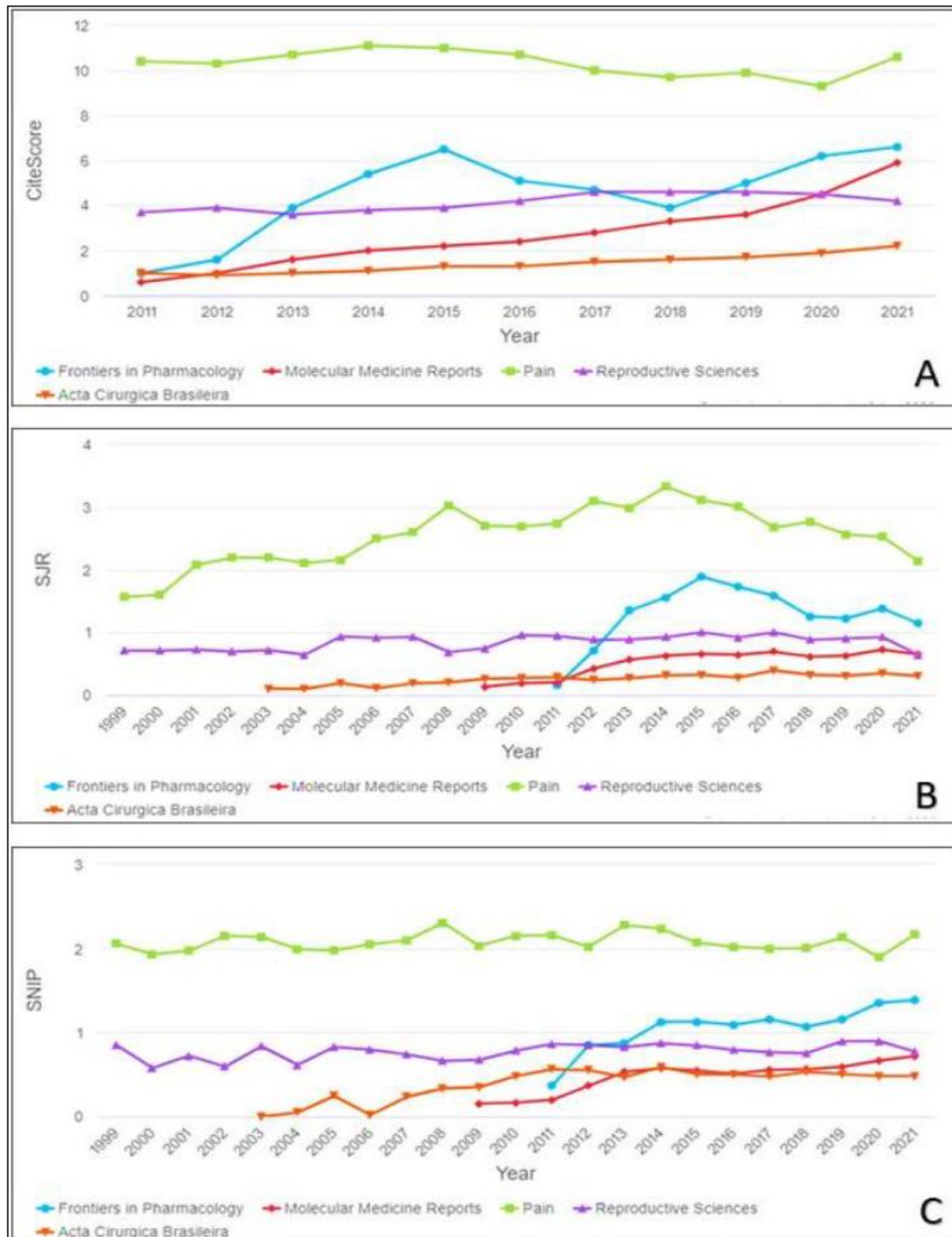
**Figure 1:** Annual publication trends in pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023.



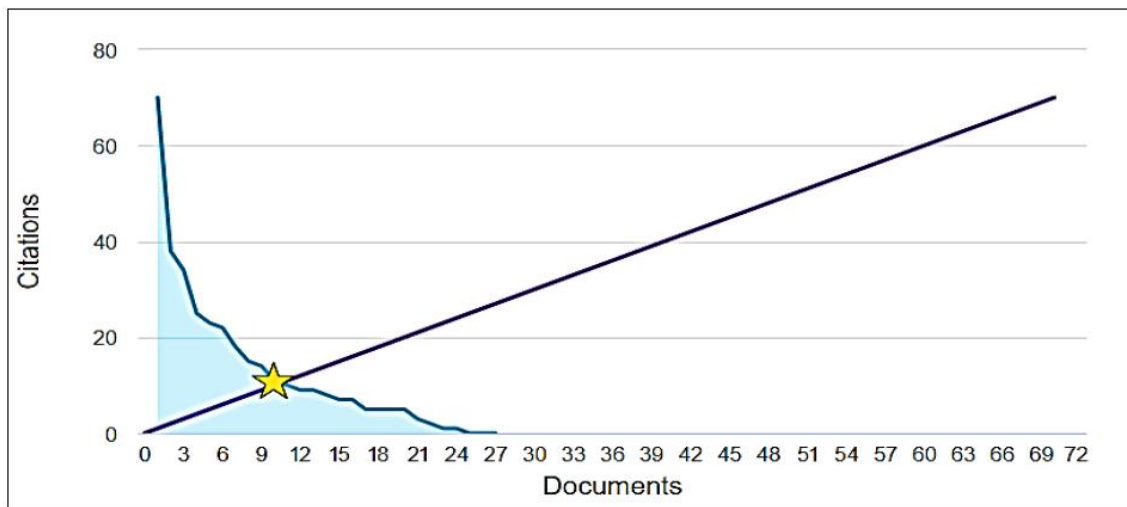
**Figure 2:** Country-wise distribution of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023.



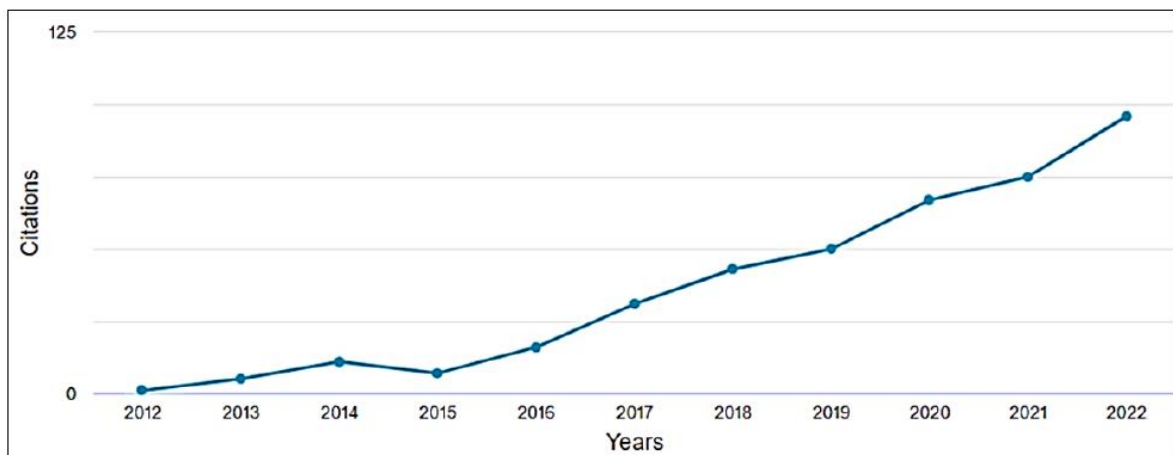
**Figure 3:** Subject area distribution of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023.



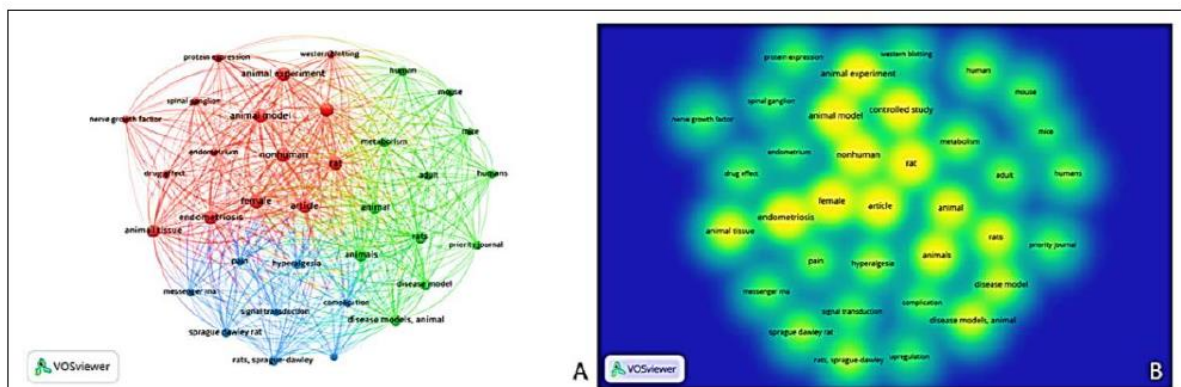
**Figure 4:** Indicators of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023. (A) CiteScore, (B) SJR, and (C) SNIP.



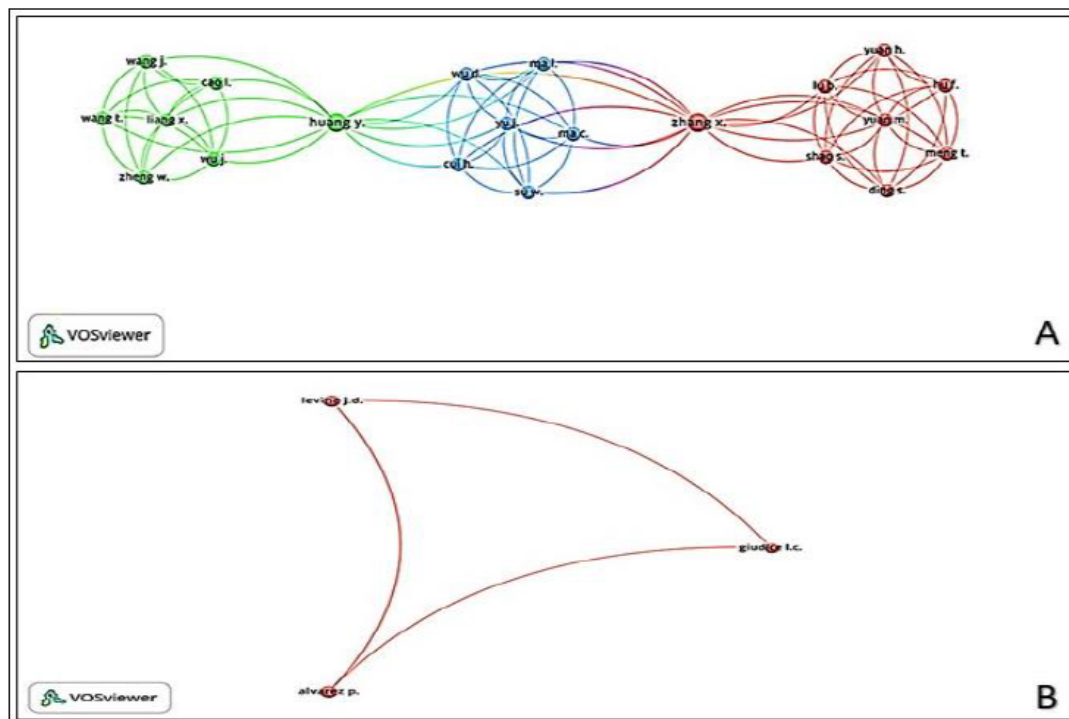
**Figure 5:** H-index of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023



**Figure 6:** Citations of publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023



**Figure 7:** (A) Co-occurrence network of keywords and (B) Word density visualization in publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023



**Figure 8:** (A) Visualization of groups of authors, and (B) Visualization of the most cited authors in publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012 to 2022, Bibliometric Review, 2023

**Table 1:** Experimental studies on pain treatment in endometriosis: publications in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023

| Year       | Author                                                                      | Title                                                                                                                        | Journal                                   | Affiliation of the 1st Author                                                                                                                                                                |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2012<br>13 | <u>Dmitrieva, N., Faircloth, E.K., Pyatok, S., Sacher, F., Patchev, V.</u>  | <u>Telemetric assessment of referred vaginal hyperalgesia and the effect of Indomethacin in a rat model of endometriosis</u> | Frontiers in Pharmacology                 | Program in Neuroscience, Florida State University, Tallahassee, FL, USA                                                                                                                      |
| 2012<br>14 | <u>Zheng, Y., Liu, X., Guo, S.-W</u>                                        | <u>Therapeutic potential of andrographolide for treating endometriosis</u>                                                   | Human Reproduction                        | Shanghai OB/GYN Hospital, Fudan University, Shanghai, China                                                                                                                                  |
| 2012<br>15 | Pelch, K.E., Sharpe-Timms, K.L., Nagel, S.C.                                | <u>Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue</u>                             | Journal of Visualized Experiments         | Obstetrics, Gynecology and Women's Health and Division of Biological Sciences, University of Missouri, USA                                                                                   |
| 2014<br>16 | <u>Alvarez, P., Levine, J.D.</u>                                            | <u>Screening the role of pronociceptive molecules in a rodent model of endometriosis pain</u>                                | Journal of Pain                           | Division of Neuroscience, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA                                                                                             |
| 2014<br>17 | Alvarez, P., Bogen, O., Chen, X., Giudice, L.C., Levine, J.D                | <u>Ectopic endometrium-derived leptin produces estrogen-dependent chronic pain in a rat model of endometriosis</u>           | Neuroscience                              | Division of Neuroscience, University of California San Francisco, California, USA.                                                                                                           |
| 2015<br>18 | Alvarez, P., Giudice, L.C., Levine, J.D.                                    | <u>Impact of surgical excision of lesions on pain in a rat model of endometriosis</u>                                        | European Journal of Pain (United Kingdom) | Division of Neuroscience, University of California San Francisco, California, USA.                                                                                                           |
| 2015<br>19 | <u>Ray, K., Fahrman, J., Mitchell, B., (...), Golovko, S., Santanam, N.</u> | <u>Oxidation-sensitive nociception involved in endometriosis-associated pain</u>                                             | Pain                                      | Depts of Pharmacology, Physiology, and Toxicology Biochemistry and Microbiology, and Obstetrics and Gynecology, Joan C. Edwards School of Medicine, Marshall University, Huntington, WV, USA |

|            |                                                                                                  |                                                                                                                                                                             |                                                           |                                                                                                                                         |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2015<br>20 | <u>Greaves, E., Temp. J., Esnal-Zufiurre, A. (...), Home. A.W., Saunders. P.T.K.</u>             | <u>Estradiol Is a Critical Mediator of Macrophage-Nerve Cross Talk in Peritoneal Endometriosis</u>                                                                          | American Journal of Pathology                             | Medical Research Council Center for Reproductive Health, The University of Edinburgh, Queen's Medical Research Institute, Edinburgh, UK |
| 2016<br>21 | <u>Palmer, S.S., Altan, M., Denis, D., (...), Bruner-Tran, K.L., Nataraja, S.G.</u>              | <u>Bentamapimod (JNK inhibitor AS602801) induces regression of endometriotic lesions in animal models</u>                                                                   | Reproductive Sciences                                     | EMD Serono Research Institute, Billerica, MA, USA                                                                                       |
| 2016<br>22 | <u>Di Paola, R., Fusco, R., Gugliandolo, E., (...), Granese, R., Cuzzocrea, S.</u>               | <u>Co-micronized palmitoylethanolamide/polydatin treatment causes endometriotic lesion regression in a rodent model of surgically induced endometriosis</u>                 | Frontiers in Pharmacology                                 | Dept. of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Italy.                                 |
| 2017<br>23 | <u>Lian, Y.-L., Cheng, M.-J., Zhang, X.-X., Wang, L.</u>                                         | <u>Elevated expression of transient receptor potential vanilloid type 1 in dorsal root ganglia of rats with endometriosis</u>                                               | Molecular Medicine Reports                                | Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai, China                                                                   |
| 2017<br>24 | <u>Doğan, H.Y., Isauder, C.K., Arici, A. (...), Delibas, I.B., Cakmak, B.</u>                    | <u>Effect of amvadin on the treatment and recurrence of endometriosis in an experimental rat study</u>                                                                      | Periodicum Biologorum                                     | Dept. of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Gaziosmanpasa University, Turkey                                                |
| 2017<br>25 | <u>Yuan, M., Ding, S., Meng, T., (...), Yuan, H., Hu, F.</u>                                     | <u>Effect of A-317491 delivered by olivolid-like polymer micelles on endometriosis pain</u>                                                                                 | International Journal of Nanomedicine                     | Institute of Marine Biology, Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan, China                                                        |
| 2018<br>26 | <u>Torres-Reverón, A., Rivera-Lopez, L.L., Flores, L., Applevard, C.B.</u>                       | <u>Antagonizing the corticotropin releasing hormone receptor 1 with antalarmin reduces the progression of endometriosis</u>                                                 | PLoS ONE                                                  | Dept. Neuroscience, University of Texas at Rio Grande Valley School of Medicine, Edinburg, Texas, USA                                   |
| 2019<br>27 | <u>Gomes Pereira, F.E.X., Medeiros, F.D.C., Rocha, H.A.L., da Silva, K.S.</u>                    | <u>Effects of omega-6/3 and omega-9/6 nutraceuticals on pain and fertility in peritoneal endometriosis in rats</u>                                                          | Acta Cirurgica Brasileira                                 | Dept. of Surgery, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brazil                                                               |
| 2019<br>28 | <u>Zhu, T.-H., Zou, G., Ding, S.-J., (...), Yao, Y.-X., Zhang, X.-M.</u>                         | <u>Mast cell stabilizer ketotifen reduces hyperalgesia in a rodent model of surgically induced endometriosis</u>                                                            | Journal of Pain Research                                  | Dept. of Obstetrics and Gynecology, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China                           |
| 2019<br>29 | <u>Warrior, P., Barve, K., Prabhakar, B.</u>                                                     | <u>Anti-arthritis effect of garcinol enriched fraction against adjuvant induced arthritis</u>                                                                               | Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery | School of Pharmacy & Technology Management, SVKM's NMIMS, Mumbai, Maharashtra, India.                                                   |
| 2019<br>30 | <u>Ge, P., Ren, J., Harrington, A.M., (...), Brierley, S.M., Hannig, G.</u>                      | <u>Linacotide treatment reduces endometriosis associated vaginal hyperalgesia and mechanical allodynia through viscerovisceral cross-Talk</u>                               | Pain                                                      | Ironwood Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA                                                                                            |
| 2020<br>31 | <u>Yarmolinskaya, M., Khobets, V., Tral, T., Tkachenko, N.</u>                                   | <u>The potentialities of oxytocin receptor inhibitors for endometriosis therapy</u>                                                                                         | Gynecological Endocrinology                               | Dept of Gynecology and Endocrinology, FSBSI, Saint Petersburg, Russia.                                                                  |
| 2020<br>32 | <u>Tian, F., Cheng, W., Hu, J., Huang, S., Sun, S.</u>                                           | <u>Effects of botulinum toxin A on endometriosis-associated pain and its related mechanism</u>                                                                              | <u>Molecular Medicine Reports</u>                         | Dept of Anesthesiology, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai, China                                         |
| 2020<br>33 | <u>Seguinot-Tarafa, Inevy; Luna, Núria; Suárez, Edu; Appleyard, Caroline B.; Flores, Idhaliz</u> | <u>Inhibition of Histone Methyltransferase EZH2 Suppresses Endometriotic Vesicle Development in a Rat Model of Endometriosis</u>                                            | Reproductive Sciences                                     | Dept of Basic Sciences, Ponce Research Institute, Ponce Health Sciences University, Puerto Rico                                         |
| 2021<br>34 | <u>Wang, C., Chen, Z., Zhao, X., (...), Guan, M.-X., Xi, Y.</u>                                  | <u>Transcriptome-based analysis reveals therapeutic effects of resveratrol on endometriosis in a rat model</u>                                                              | Drug Design, Development and Therapy                      | The Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China                                                 |
| 2021<br>35 | <u>Zhang, W., Wang, J., Wu, J., (...), Liang, X., Cao, L.</u>                                    | <u>Exploration of the Modulatory Property Mechanism of ELeng Capsule in the Treatment of Endometriosis Using Transcriptomics Combined with Systems Network Pharmacology</u> | Frontiers in Pharmacology                                 | The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, China                                               |
| 2021<br>36 | <u>Su, W., Cui, H., Wu, D., (...), Huang, Y., Ma, C.</u>                                         | <u>Suppression of TLR4-MyD88 signaling pathway attenuated</u>                                                                                                               | Journal of Neuroinflammation                              | Dept of Anesthesiology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese                                                                  |

|            |                                                                                                             |                                                                                                                                                            |                                                       |                                                                                                                                          |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                                                                                                             | <u>chronic mechanical pain in a rat model of endometriosis</u>                                                                                             |                                                       | Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, China.                                                            |
| 2021<br>37 | <u>Farahani, Z.K., Taherianfard, M., Naderi, M.M., Ferrero, H.</u>                                          | <u>Possible therapeutic effect of royal jelly on endometriotic lesion size, pain sensitivity, and neurotrophic factors in a rat model of endometriosis</u> | Physiological Reports                                 | Physiology Division of Basic Sciences Department, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.                        |
| 2021<br>38 | <u>Davenport, A.J., Neaqqoe, L., Bräuer, N., (...), Zollner, T.M., Fischer, O.M.</u>                        | <u>Eliapixant is a selective P2X3 receptor antagonist for the treatment of disorders associated with hypersensitive nerve fibers</u>                       | Scientific Reports                                    | Discovery Chemistry, Dorothy Crowfoot Hodgkin Campus, Evotec UK, United Kingdom.                                                         |
| 2022<br>39 | <u>Kaplan, S., Kirici, P., Türk, A.</u>                                                                     | <u>The effects of adalimumab on the rat autotransplantation endometriosis model: A placebo-controlled randomized study</u>                                 | <u>Advances in Clinical and Experimental Medicine</u> | Faculty of Medicine, Adiyaman University, Turkey.                                                                                        |
| 2022<br>40 | <u>Akkol EK, Karpuz B, Türkanoğlu G, Coşgunçelebi FG, Taştan H, Aschner M, Khatkar A, Sobarzo-Sánchez E</u> | <u>The Phytochemical Profile and Biological Activity of Malva neglecta Wallr in Surgically Induced Endometriosis Model in Rats</u>                         | Molecules                                             | Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University Turkey                                                                 |
| 2022<br>41 | <u>Qin Z, Dong Z, Liu J, Zhong A, Bao M, Wang H, Yu H, Zhang S, Zhang W, Shen L, Wu J, Chen J.</u>          | <u>A Preliminary Study on the Effects of Black Cohosh Preparations on Bone Metabolism of Rat Models with GnRH-a-Induced Peri-Menopausal Symptoms</u>       | Front Endocrinol (Lausanne)                           | Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Changzhou No.2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou, China |
| 2022<br>42 | <u>Zong C, Sun L, Xu X, Xue X.</u>                                                                          | <u>Huayu Sanjie Enema Liquid Relieves Pain in Endometriosis Model Rats by Inhibiting Inflammation, Peripheral Sensitization, and Pelvic Adhesion</u>       | Evid Based Complement Alternate Med                   | Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China                                                              |

**Table 2:** Citations of the top 5 publications on pain treatment in endometriosis in experimental rat models, 2012-2022, Bibliometric Review, 2023

| Article title                                                                                                                                               | Journal                       | Number of citations |      |      |      |      |      |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|-------|
|                                                                                                                                                             |                               | <2018               | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | Total |
| <u>Estradiol is a Critical Mediator of Macrophage-Nerve Cross Talk in Peritoneal Endometriosis</u>                                                          | American Journal of Pathology | 71                  | 43   | 50   | 67   | 75   | 96   | 402   |
| <u>Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue</u>                                                            | J. of Visualized Experiments  | 14                  | 12   | 13   | 15   | 11   | 16   | 80    |
| <u>Co-micronized palmitoylethanolamide/polydatin treatment causes endometriotic lesion regression in a rodent model of surgically induced endometriosis</u> | Frontiers in Pharmacology     | 10                  | 5    | 12   | 5    | 5    | 7    | 44    |
| <u>Bentamapimod (JNK inhibitor AS602801) induces regression of endometriotic lesions in animal models</u>                                                   | Reproductive Sciences         | 4                   | 6    | 6    | 5    | 11   | 6    | 38    |
| <u>Oxidation-sensitive nociception involved in endometriosis-associated pain</u>                                                                            | Pain                          | 2                   | 4    | 3    | 6    | 11   | 0    | 25    |
|                                                                                                                                                             |                               | 8                   | 2    | 4    | 3    | 3    | 5    | 25    |

## References

1. Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, Shalev V. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG*. 2018 Jan;125(1):55-62.
2. Tomassetti C, D'Hooghe T. Endometriosis and infertility: Insights into the causal link and management strategies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Aug;51:25-33.

3. Mowers EL, Lim CS, Skinner B, Mahnert N, Kamdar N, Morgan DM, As-Sanie S. Prevalence of Endometriosis During Abdominal or Laparoscopic Hysterectomy for Chronic Pelvic Pain. *Obstet Gynecol*. 2016 Jun;127(6):1045-1053.
4. Berlanda N, Somigliana E, Viganò P, Vercellini P. Safety of medical treatments for endometriosis. *Expert Opin Drug Saf*. 2016 Jan;15(1):21-30.
5. Zubrzycka A, Zubrzycki M, Janecka A, Zubrzycka M. New Horizons in the Etiopathogenesis and Non-Invasive Diagnosis of Endometriosis. *Curr Mol Med*. 2015;15(8):697-713.
6. Chantalat E, Valera MC, Vaysse C, Noirrit E, Rusidze M, Weyl A, Vergriete K, Buscail E, Lluel P, Fontaine C, Arnal JF, Lenfant F. Estrogen Receptors and Endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 17;21(8):2815.
7. Malvezzi H, Marengo EB, Podgaec S, Piccinato CA. Endometriosis: current challenges in modeling a multifactorial disease of unknown etiology. *J Transl Med*. 2020 Aug 12;18(1):311.
8. Yu D, Wang W, Zhang W, Zhang S. A bibliometric analysis of research on multiple criteria decision making. *Curr Sci*. (2018) 1144:747–58.
9. Linnenluecke, MK; Marrone, M.; Singh, AK. Conducting systematic literature reviews and bibliometric analyses. *Aust. J. Manag*. Vol 45, 175–194. 2020.
10. Zhu, J., Liu, W. (2020). A tale of two databases: the use of Web of Science and Scopus in academic papers. *Scientometrics*. 2020 Feb, 123 (1), 321-335.
11. Garcia JBS, de Moraes ÉB, Neto JOB. A Bibliometric Analysis of Published Literature in Postoperative Pain in Elderly Patients in Low- and Middle-Income Countries. *J Clin Med*. 2021 May 27;10(11):2334.
12. Zhao Y, Zhang Z, Guo S, Feng B, Zhao X, Wang X, Wang Y. Bibliometric Analysis of Research Articles on Pain in the Elderly Published from 2000 to 2019. *J Pain Res*. 2021 Apr 16; 14:1007-1025.
13. Dmitrieva N, Faircloth EK, Pyatok S, Sacher F, Patchev V. Telemetric assessment of referred vaginal hyperalgesia and the effect of indomethacin in a rat model of endometriosis. *Front Pharmacol*. 2012 Aug 30;3:158.
14. Zheng Y, Liu X, Guo SW. Therapeutic potential of andrographolide for treating endometriosis. *Hum Reprod*. 2012 May;27(5):1300-13.
15. Pelch KE, Sharpe-Timms KL, Nagel SC. Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue. *J Vis Exp*. 2012 Jan 6;(59):e3396.
16. Alvarez P, Levine JD. Screening the role of pronociceptive molecules in a rodent model of endometriosis pain. *J Pain*. 2014 Jul;15(7):726-33.
17. Alvarez P, Bogen O, Chen X, Giudice LC, Levine JD. Ectopic endometrium-derived leptin produces estrogen-dependent chronic pain in a rat model of endometriosis. *Neuroscience*. 2014 Jan 31;258:111-20.
18. Alvarez P, Giudice LC, Levine JD. Impact of surgical excision of lesions on pain in a rat model of endometriosis. *Eur J Pain*. 2015 Jan;19(1):103-10.
19. Ray K, Fahrman J, Mitchell B, Paul D, King H, Crain C, Cook C, Golovko M, Brose S, Golovko S, Santanam N. Oxidation-sensitive nociception involved in endometriosis-associated pain. *Pain*. 2015 Mar;156(3):528-539.

20. Greaves E, Temp J, Esnal-Zufiurre A, Mechsner S, Horne AW, Saunders PT. Estradiol is a critical mediator of macrophage-nerve cross talk in peritoneal endometriosis. *Am J Pathol*. 2015 Aug;185(8):2286-97.
21. Palmer SS, Altan M, Denis D, Tos EG, Gotteland JP, Osteen KG, Bruner-Tran KL, Nataraja SG. Bentamapimod (JNK Inhibitor AS602801) Induces Regression of Endometriotic Lesions in Animal Models. *Reprod Sci*. 2016 Jan;23(1):11-23.
22. Di Paola R, Fusco R, Gugliandolo E, Crupi R, Evangelista M, Granese R, Cuzzocrea S. Co-micronized Palmitoylethanolamide/Polydatin Treatment Causes Endometriotic Lesion Regression in a Rodent Model of Surgically Induced Endometriosis. *Front Pharmacol*. 2016 Oct 14;7:382.
23. Lian YL, Cheng MJ, Zhang XX, Wang L. Elevated expression of transient receptor potential vanilloid type 1 in dorsal root ganglia of rats with endometriosis. *Mol Med Rep*. 2017 Aug;16(2):1920-1926.
24. Dogru HY, Isguder CK, Arici A, Ozsoy AZ, Delibas IB, Cakmak B. Effect of Amygdalin on the treatment and recurrence of endometriosis in an experimental rat study. *Periodicum Biologorum*, 119 (3), p. 173-180, 2017.
25. Yuan M, Ding S, Meng T, Lu B, Shao S, Zhang X, Yuan H, Hu F. Effect of A-317491 delivered by glycolipid-like polymer micelles on endometriosis pain. *Int J Nanomedicine*. 2017 Nov 9;12:8171-8183.
26. Torres-Reverón A, Rivera-Lopez LL, Flores I, Appleyard CB. Antagonizing the corticotropin releasing hormone receptor 1 with antalarmin reduces the progression of endometriosis. *PLoS One*. 2018 Nov 14;13(11):e0197698.
27. Pereira FEXG, Medeiros FDC, Rocha HAL, Silva KSD. Effects of omega-6/3 and omega-9/6 nutraceuticals on pain and fertility in peritoneal endometriosis in rats. *Acta Cir Bras*. 2019 May 6;34(4):e201900405.
28. Zhu TH, Zou G, Ding SJ, Li TT, Zhu LB, Wang JZ, Yao YX, Zhang XM. Mast cell stabilizer ketotifen reduces hyperalgesia in a rodent model of surgically induced endometriosis. *J Pain Res*. 2019 Apr 29;12:1359-1369.
29. Warriar P, Barve K, Prabhakar B. Anti-Arthritic Effect of Garcinol Enriched Fraction Against Adjuvant Induced Arthritis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2019;13(1):49-56.
30. Ge P, Ren J, Harrington AM, Grundy L, Castro J, Brierley SM, Hannig G. Linacotide treatment reduces endometriosis-associated vaginal hyperalgesia and mechanical allodynia through viscerovisceral cross-talk. *Pain*. 2019 Nov;160(11):2566-2579.
31. Yarmolinskaya M, Khobets V, Tral T, Tkachenko N. The potentialities of oxytocin receptor inhibitors for endometriosis therapy. *Gynecol Endocrinol*. 2020;36(sup1):16-19.
32. Tian F, Cheng W, Hu J, Huang S, Sun S. Effects of botulinum toxin A on endometriosis-associated pain and its related mechanism. *Mol Med Rep*. 2020 Nov;22(5):4351-4359.
33. Seguinot-Tarafa I, Luna N, Suarez E, Appleyard CB, Flores I. Inhibition of Histone Methyltransferase EZH2 Suppresses Endometriotic Vesicle Development in a Rat Model of Endometriosis. *Reprod Sci*. 2020 Sep;27(9):1812-1820.
34. Wang C, Chen Z, Zhao X, Lin C, Hong S, Lou Y, Shi X, Zhao M, Yang X, Guan MX, Xi Y. Transcriptome-Based Analysis Reveals Therapeutic Effects of Resveratrol on Endometriosis in a Rat Model. *Drug Des Devel Ther*. 2021 Sep 29;15:4141-4155.

35. Zheng W, Wang J, Wu J, Wang T, Huang Y, Liang X, Cao L. Exploration of the Modulatory Property Mechanism of ELeng Capsule in the Treatment of Endometriosis Using Transcriptomics Combined With Systems Network Pharmacology. *Front Pharmacol*. 2021 Jun 18;12:674874.
36. Su W, Cui H, Wu D, Yu J, Ma L, Zhang X, Huang Y, Ma C. Suppression of TLR4-MyD88 signaling pathway attenuated chronic mechanical pain in a rat model of endometriosis. *J Neuroinflammation*. 2021 Mar 5;18(1):65.
37. Farahani ZK, Taherianfard M, Naderi MM, Ferrero H. Possible therapeutic effect of royal jelly on endometriotic lesion size, pain sensitivity, and neurotrophic factors in a rat model of endometriosis. *Physiol Rep*. 2021 Nov;9(22):e15117.
38. Davenport AJ, Neagoe I, Bräuer N, Koch M, Rotgeri A, Nagel J, Laux-Biehlmann A, Machet F, Coelho AM, Boyce S, Carty N, Gemkow MJ, Hess SD, Zollner TM, Fischer OM. Eliapixant is a selective P2X3 receptor antagonist for the treatment of disorders associated with hypersensitive nerve fibers. *Sci Rep*. 2021 Oct 6;11(1):19877.
39. Kaplan S, Kırıcı P, Türk A. The effects of adalimumab on the rat autotransplantation endometriosis model: A placebo-controlled randomized study. *Adv Clin Exp Med*. 2022 Apr;31(4):417-426.
40. Akkol EK, Karpuz B, Türkcanoğlu G, Coşgunçelebi FG, Taştan H, Aschner M, Khatkar A, Sobarzo-Sánchez E. The Phytochemical Profile and Biological Activity of *Malva neglecta* Wallr. in Surgically Induced Endometriosis Model in Rats. *Molecules*. 2022 Nov 15;27(22):7869.
41. Qin Z, Dong Z, Liu J, Zhong A, Bao M, Wang H, Yu H, Zhang S, Zhang W, Shen L, Wu J, Chen J. A Preliminary Study on the Effects of Black Cohosh Preparations on Bone Metabolism of Rat Models With GnRH-a-Induced Peri-Menopausal Symptoms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 9;13:854345.
42. Zong C, Sun L, Xu X, Xue X. Huayu Sanjie Enema Liquid Relieves Pain in Endometriosis Model Rats by Inhibiting Inflammation, Peripheral Sensitization, and Pelvic Adhesion. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022 Jun 28;2022:5256578.
43. European Union. Principais realizações da União Europeia e benefícios tangíveis [Main achievements of the European Union and tangible benefits]. [https://european-union.europa.eu/priorities-and-actions/achievements\\_pt](https://european-union.europa.eu/priorities-and-actions/achievements_pt). Cited 2023 feb 21.
44. Podgaec S, Caraça DB, Lobel A, Bellelis P, Lasmar BP, Lino CA, et al. São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO). 2018. Protocolo FEBRASGO - Ginecologia, no. 32 [Protocol FEBRASGO - Gynecology, no. 32]. National Commission Specialized in Endometriosis.
45. Salomé, DGM; Braga, ACBP; Lara TM; Caetano, AO. Endometriosis: national epidemiology of the last 5 years. *Revista de Saúde*. 2020;11(2):39-43. <https://doi.org/10.21727/rs.v11i1.2427>
46. Yang S, Zhao S, Ye Y, Jia L, Lou Y. Global research trends on the links between gut microbiota and cancer immunotherapy: A bibliometric analysis (2012-2021). *Front Immunol*. 2022 Aug 24;13:952546.
47. Bonorino, C. Pesquisa científica no Brasil é menosprezada [Pesquisa científica no Brasil é menosprezada]. Mais ZH, Frutos da Ciência. Caderno ProA, 15/08/2015. Available from: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/porto-alegre/noticia/2015/08/pesquisa-cientifica-no-brasil-e-menosprezada-4825155.html>

48. São Bento PAS, Moreira MCN. The experience of illness of women with endometriosis: narratives about institutional violence. *Ciênc Saúde Coletiva* [Internet]. 2017;22(9):3023–32. Available from: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017229.03472017>.
49. Schenken R. Overview of the treatment of endometriosis [Internet]. *UpToDate*; 2014. <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-endometriosis> Cited 2023 feb 21.
50. Doğan G, Karaca O. A bibliometric analysis of the field of anesthesia during 2009-2018. *Braz J Anesthesiol.* 2020;70(2):140-52. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2020.04.013>

## 5.11 Artigo 2

Artigo aprovado para publicação no periódico Revista Contexto & Saúde (ANEXO C).

### **Talidomida no manejo da dor em endometriose: uma revisão de escopo de estudos experimentais**

### **Thalidomide in endometriosis pain management: a scoping review of experimental studies**

#### **Resumo**

Este estudo buscou investigar a aplicabilidade da talidomida no manejo da dor na endometriose induzida em animais. Foi realizada uma revisão de escopo confeccionada e organizada seguindo o método Joanna Briggs Institute, além de seguir os padrões do PRISMA – ScR. Foram feitas pesquisas em seis bases de dados eletrônicas associando descritores e as palavras chaves, por meio de busca booleana correspondente aos blocos conceituais voltados para recuperação de estudos sobre endometriose, dor, manejo da dor e talidomida. Os países dos estudos foram: Irã (n=1, 50%) e Turquia (n = 1, 50%). Todos os artigos (n = 2; 100%) foram publicados em inglês. Quanto ao ano de publicação, observa-se que todos foram publicados nos últimos 10 anos. Nos estudos onde há comparação entre talidomida e placebo observa-se que há uma alta resposta associada com a redução de fatores inflamatórios impactando diretamente na melhora clínica dos quadros algícos com benefícios que levam até a redução de fatores de crescimento e controle do ciclo das metaloproteinases (MPP). A busca dos estudos mostrou a atividade antiangiogênica e anti-inflamatória do fármaco, o que sugere uma opção para ser utilizada como tratamento de dor, contudo poucas literaturas estão disponíveis com talidomida.

Palavras-chave: Dor. Manejo da dor. Endometriose. Talidomida.

## Abstract

**Objective:** To investigate the applicability of thalidomide in the management of pain in induced endometriosis in animals. **Methods:** A scoping review was carried out and organized following the Joanna Briggs Institute method, in addition to following the PRISMA – ScR standards. Searches were carried out in six electronic databases, associating descriptors and keywords, through a Boolean search corresponding to the conceptual blocks aimed at retrieving studies on endometriosis, pain, pain management and thalidomide. **Results:** The study countries were: Iran (n =1, 50%) and Turkey (n = 1, 50%). All articles (n = 2; 100%) were published in English. As for the year of publication, it is observed that all were published in the last 10 years. In studies where thalidomide and placebo are compared, it is observed that there is a high response associated with the reduction of inflammatory factors, directly impacting the clinical improvement of pain conditions with benefits that lead to the reduction of growth factors and control of the metalloproteinase cycle (MPP). **Conclusion:** The search for studies showed the antiangiogenic and anti-inflammatory activity of the drug, which suggests an option to be used as a pain treatment, however few literatures are available with thalidomide.

**Keywords:** Pain. Pain management. Endometriosis. Thalidomide.

## Introdução

A endometriose é uma das doenças ginecológicas mais comuns do mundo e sua patogênese ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que há uma atividade anormal do sistema imunológico, que causa uma superativação de fatores inflamatórios que culminam no início do quadro, trazendo rapidamente crises algícas agudas e intensas na região pélvica e abdominal<sup>1,2</sup>.

As metaloproteínases são as principais enzimas que estão associadas com a patogênese da nocicepção na endometriose, pois através desta inicia-se o processo inflamatório local. É responsável pela destruição da estrutura epitelial do endométrio, facilitando a adesão e invasão de células ectópicas no revestimento peritoneal, um processo cíclico que quando não tratado resulta na piora clínica da dor na doença<sup>3</sup>.

A relação entre dor e endometriose é mais evidente na fase crônica da doença, onde esta adquire características neuropáticas, com alterações entre as fibras nervosas nas regiões lesionadas junto a densidade e a qualidade da transmissão sináptica<sup>4</sup>. Observa-se também que há um aumento na atividade angiogênica na região da lesão, intensificando o efeito inflamatório

devido a maior disposição de fatores advindos da circulação. A somatória dos dois efeitos, sendo estimulado a longo prazo, desenvolve a forma crônica da endometriose dificultando o tratamento<sup>5</sup>.

O grande desafio ao se tratar endometriose em sua forma crônica são os episódios de dor refratária observados nesse estágio da doença. Os bloqueadores hormonais são comumente utilizados como alternativa terapêutica, entretanto, seu espectro de ação não abrange um efeito analgésico sobre este tipo de dor, daí a necessidade da busca por outras opções<sup>6,7</sup>.

A talidomida é um derivado sintético do ácido glutâmico, com mecanismo de ação ainda desconhecido. Estima-se que esta reduz os níveis de diversas citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), além de inibir a interleucina 12, impactando na redução de proliferação de linfócitos. Isso traz um bom efeito para tratamento de dor com característica nociceptiva e a longo prazo, redução dos fatores responsáveis pela cronificação das dores na endometriose. O uso deste fármaco é comum na área da oncologia, pelo seu efeito antiangiogênico, diminuindo bastante o percentual de crescimento tumoral. No caso da endometriose, esse efeito pode ser benéfico, reduzindo o fluxo de fatores inflamatórios e células responsáveis por manter a inflamação tecidual<sup>1,8</sup>.

## **Métodos de revisão**

### **Protocolo**

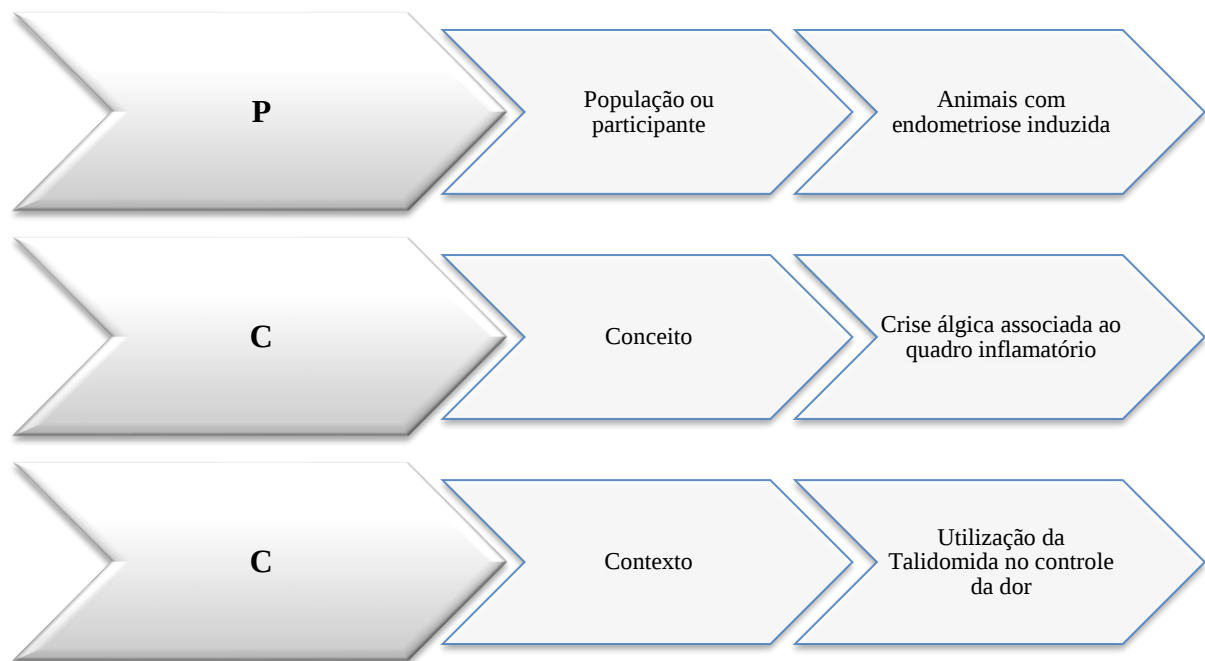
Esta revisão de escopo foi confeccionada e organizada seguindo o método Joanna Briggs Institute, além de seguir os padrões do PRISMA – ScR. Também possui seu protocolo com registro no OSF Home, com link de acesso: [osf.io/s23e6](https://osf.io/s23e6). Todos os descritores foram validados através de busca pelo Descritores em Ciências da Saúde, Medical Subject Headings e Embase Subject Headings, antes da busca nas bases de dados<sup>9-12</sup>.

### **Critérios de inclusão**

Nesta revisão optou-se pela aplicação da metodologia do acrônimo PCC; P: população/pacientes; C: conceito; C: contexto, norteando a formulação da pergunta, coleta dos dados e inclusão dos estudos nos resultados. Ao se adequar o objeto desse estudo à estratégia PCC, obteve-se como pergunta norteadora: Quais são os estudos experimentais com talidomida

no manejo da dor na endometriose? Ao qual “Animais com endometriose induzida” representa a população, “crise álgica associada ao quadro inflamatório”, refere-se ao conceito e “utilização da talidomida no controle da dor” é o contexto da pesquisa (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma do processo de escolha da pergunta norteadora e orientação de busca inicial da base de dados



Foram escolhidos estudos que possuíam apenas animais acometidos por endometriose com crise álgica induzida exclusivamente pela endometriose, e que tivessem como finalidade principal do estudo o manejo da dor. Os únicos desenhos de estudo admitidos foram os experimentais e quase experimentais, incluindo ensaios clínicos controlados randomizados e estudos controlados não randomizados, antes e depois dos estudos e estudos de séries temporais interrompidos e que tivesse como desfecho o controle álgico por meio de tratamento com o medicamento talidomida.

### Fontes de dados

As bases de dados selecionadas foram a Medlars Online (MEDLINE) (via Pubmed), Scopus, Excerpta Medica Database (EMBASE), Literatura Latino Americana em Ciências da

Saúde (LILACS), Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature (CINAHL) Plus With Full Text, Google Scholar e literatura cinzenta.

### Estratégia de pesquisa

Foram realizadas pesquisas em seis bases de dados eletrônicas por associando descritores e as palavras chaves, por meio de busca booleana correspondente aos blocos conceituais voltados para recuperação de estudos sobre endometriose, dor, manejo da dor, e talidomida. Não foram excluídos idiomas na busca de artigos, considerando todos os estudos relevantes sem limites nas datas de publicação. As buscas foram realizadas de fevereiro a dezembro de 2022, sendo aplicado filtro de artigos com resumo disponível para análise, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Registros identificados por meio de estratégias de busca em bases de dados eletrônicas

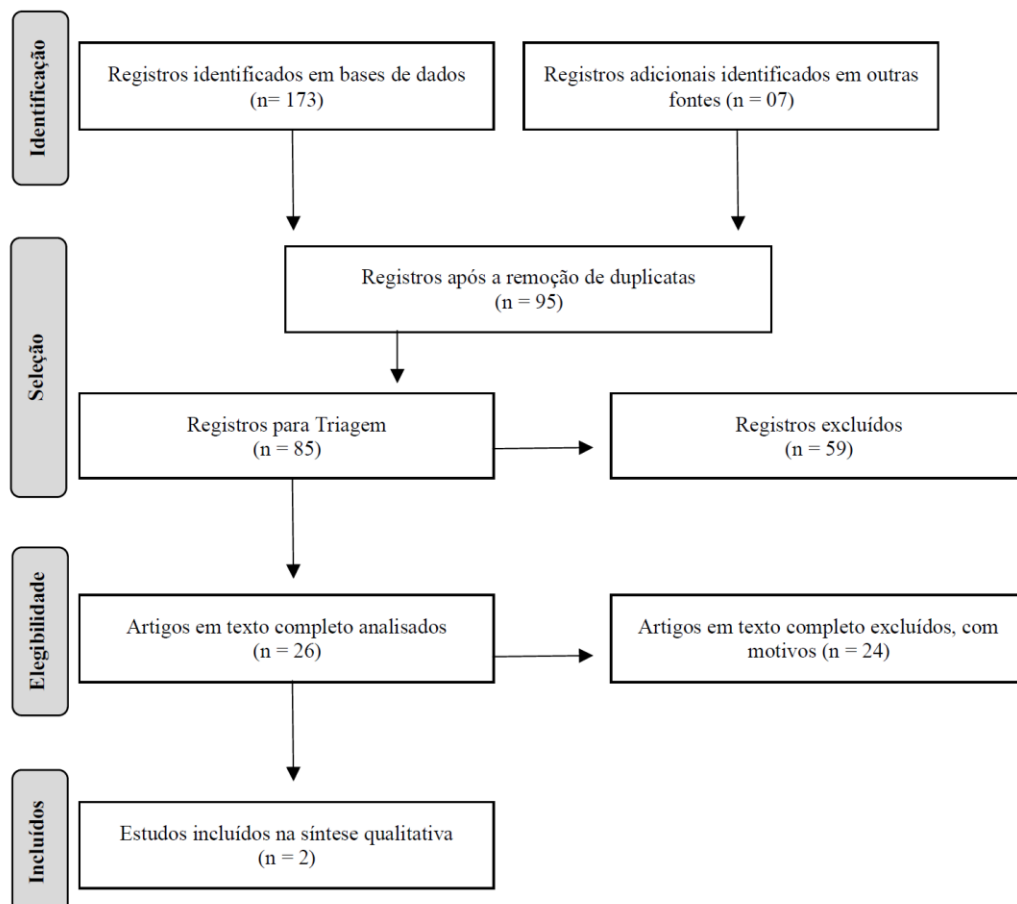
| BASE                                                             | ESTRATÉGIA DE BUSCA                                                                                         | REGISTROS ENCONTRADOS |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>PubMed</b>                                                    | endometriosis AND thalidomide                                                                               | 4                     |
| <b>EMBASE</b>                                                    | endometriosis thalidomide                                                                                   | 28                    |
| <b>LILACS</b>                                                    | endometriosis thalidomide                                                                                   | 1                     |
| <b>SCOPUS</b>                                                    | endometriosis thalidomide                                                                                   | 28                    |
| <b>COCHRANE</b>                                                  | endometriosis thalidomide                                                                                   | 0                     |
| <b>Web of Science</b>                                            | endometriosis thalidomide                                                                                   | 11                    |
| <b>Subtotal</b>                                                  |                                                                                                             | 72                    |
| <b>NOVOS TERMOS CONFORME SINÔNIMOS – MeSH/DeCS/EMTREE</b>        |                                                                                                             |                       |
| <b>PubMed</b>                                                    | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 4                     |
| <b>EMBASE</b>                                                    | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 115                   |
| <b>LILACS</b>                                                    | Usado os filtros = animal experiment OU animal model                                                        | 4                     |
|                                                                  | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 1                     |
| <b>SCOPUS</b>                                                    | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 28                    |
| <b>COCHRANE</b>                                                  | Usado os filtros = animal OR animals OR in vitro study OR disease models, animal OR animal model            | 12                    |
|                                                                  | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 0                     |
| <b>Web of Science</b>                                            | (Sedoval OR thalomide OR thalidomide) AND (Endometrioses OR Endometrioma OR Endometriomas OR endometriosis) | 11                    |
|                                                                  | Animal OR in vitro                                                                                          | 5                     |
| <b>TOTAL DE ACHADOS com filtros e sinônimos MeSH/DeCS/EMTREE</b> |                                                                                                             | 180                   |

## Seleção de fontes de evidência

Foram realizados dois tipos de busca, uma com termos gerais para ampliar o número de artigos e identificar possíveis literaturas para comparação com os critérios de inclusão, nessa foram encontrados 72 artigos. Foi realizada uma segunda busca termos mais específicos, na qual foram encontrados mais 180 artigos, todos também inclusos na busca geral. Os 180 registros foram importados para o gerenciador de referências Mendeley desktop, e destes, foram removidas 95 duplicações, restando 85 resumos para análise. Foram excluídos conforme título e resumo mais 59 registros, restando 26 para análise dos textos completos recuperados.

Os 26 estudos foram triados dentro dos critérios de elegibilidade por três examinadores independentes, resultando em 16 artigos. Posteriormente, foram excluídos 14, totalizando 2 artigos elegíveis para o estudo (Tabela 1), conforme o fluxograma de seleção (Figura 2), que especifica cada etapa da análise, seguindo o modelo PRISMA 2018 *Flow Diagram*<sup>11</sup>.

Figura 2 – Fluxograma do processo de inclusão e exclusão dos estudos seguindo modelo PRISMA (2020)



## Procedimento para extração

A extração de dados foi realizada após da leitura integral dos artigos, considerando previamente a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão e realizada por três revisores independentes, uma a cada 2 bases. O banco de dados foi constituído em forma de tabela, utilizando o software Microsoft Excel 2010. As informações foram apresentadas na seguinte ordem na tabela: Autor/ ano, Objetivo, Medicamento, N e o Tipo de Estudo; população estudada (População); ambiente de estudo (Contexto); avaliação do uso da talidomida (Conceito); pontos positivos e negativos quanto ao uso da talidomida; resultados extraídos; se estudo selecionado ou não.

## Síntese dos resultados

Os dados foram analisados e expostos no texto na forma estatística descritiva, apresentando frequências absolutas e relativas. Para as análises, foi utilizado o *software* SPSS Statistics 25.0, 2017.

## Resultados

Os dois estudos incluídos nessa revisão, observou-se 100% de êxito no uso da talidomida como terapêutica no controle da dor. Os estudos são ensaios experimentais randomizados, e seu resumo detalhado encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Artigos presentes no estudo

| Autor/ ano                   | Objetivo                                                                          | Medicamento             | n  | Tipos de Estudo            |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----|----------------------------|
| Azimirad et al. <sup>1</sup> | Avaliação do efeito da talidomida em ratos com endometriose induzida pós cirurgia | Talidomida X<br>Placebo | 23 | Ensaio clínico randomizado |
| Bakacak et al. <sup>13</sup> | Avaliação do efeito da talidomida em ratos com endometriose induzida pós cirurgia | Talidomida X<br>Placebo | 8  | Ensaio clínico randomizado |

Os países dos estudos foram: Irã (n =1, 50%) e Turquia (n = 1, 50%). Todos os artigos (n = 2; 100%) foram publicados em inglês. Quanto ao ano de publicação, observa-se que todos foram publicados nos últimos 10 anos.

Em estudos onde há comparação entre talidomida e placebo observa-se que há uma alta resposta associada com a redução de fatores inflamatórios impactando diretamente na melhora clínica dos quadros algícos com benefícios que levam até a redução de fatores de crescimento e controle do ciclo das metaloproteinases (MPP). Ratificando que os resultados possuem diferenças de médias estatisticamente significantes, Bakacak et al.<sup>13</sup>, ao induzir a endometriose em ratas e tratá-las com talidomida 100 mg/kg (n=8) e controle (n=8) com solução salina 0,5 ml/kg usando gavagem oral, observaram que houve diminuição significativamente no volume médio do implante no grupo administrado com talidomida após o tratamento (53,3 e 22,9 mm<sup>3</sup> respectivamente, p=0,012). Diferenças demonstradas nos escores histopatológicos do grupo talidomida (3 e 1 respectivamente, p=0,012) não foram observadas no grupo controle. Diminuições foram observadas nos níveis de VEGF-A e mieloperoxidase (MPO) de marcadores oxidativos (p=0,004, p=0,037, respectivamente).

Corroborando com o estudo de Bakacak et al.<sup>13</sup>, Azimirad et al.<sup>1</sup> também comprova a eficácia analgésica, anti-inflamatória e antiangiogênica da talidomida ao mostrar, em ensaio clínico experimental, que o uso da droga numa dose de 22 mg/dia resultou na diminuição do VEGF, IL-6 e contagem do número de leucócitos e específicos linfócitos (p=0,07; 0,07; 0,02; 0,01 e 0,001), respectivamente no fluido peritoneal de ratas com endometriose induzida em relação a um grupo controle.

## **Discussão**

### **Eficácia da talidomida no manejo da dor em endometriose**

O quadro algíco na endometriose é resultado da ação das metaloproteinases, iniciando a cascata de dor a partir do ciclo inflamatório, ocorrendo múltiplas mudanças na cavidade peritoneal. Há ativação de diversas quimiocinas e citocinas envolvidas estimulando nociceptores locais responsáveis pelo quadro doloroso da endometriose<sup>3,5</sup>.

Dentre as citocinas responsáveis pela ativação nociceptiva, podemos citar as prostaglandinas, histamina e bradicinina sendo fatores mediadores inflamatórios, realizando vasodilatação e permitindo a permeabilização capilar, facilitando a entrada de células do sistema leucocitário do tecido periférico para o início e manutenção do quadro nociceptivo. As células

do sistema leucocitário são responsáveis pela manutenção do quadro inflamatório disponibilizando citocinas como TNF-alfa, IFN-gama, interleucinas, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), importantes para a manutenção do quadro inflamatório<sup>6,7</sup>.

Entre os estudos avaliados há um consenso sobre a ação anti-inflamatória ou efeito sobre fatores inflamatórios e de crescimento que colaboram com a melhora clínica da dor, ilustrando a eficácia da talidomida nas crises algícas na endometriose<sup>1,13</sup>.

O controle do mecanismo fisiopatológico da dor na endometriose vem sendo priorizada, e a talidomida tem se destacado como uma das principais novas propostas. Devido as suas propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e imunomoduladoras, está sendo utilizada no tratamento de diversas doenças, como mieloma múltiplo e eritema nodoso hansênico, entre outras. Seu efeito antitumoral ocorre particularmente através da inibição do TNF-alfa, IL-8, presentes nas células estromais do endométrio<sup>1,13</sup>.

A implantação de células ectópicas na cavidade endometrial resulta em um processo inflamatório, pela produção de citocinas e prostaglandinas pró-inflamatórias e supressão de interleucinas anti-inflamatórias. Azimirad et al.<sup>1</sup> comprovaram a eficácia da atividade anti-inflamatória e antiangiogênica da talidomida ao mostrar, em ensaio clínico experimental, que o uso do fármaco numa dose de 22 mg/dia resultou na diminuição do VEGF, IL-6 e contagem do número de leucócitos no fluido peritoneal de ratas com endometriose induzida em relação a um grupo controle. Nesse estudo não foi possível comprovar a ação sobre o TNF-alfa, contrário à literatura, e os autores consideraram esse resultado erro de metodologia.

Bakacak et al.<sup>13</sup>, em um estudo similar demonstraram que houve diminuição no volume dos implantes no grupo tratado com talidomida na dose de 100mg/kg/dia por 4 semanas em relação ao controle, bem como a redução do VEGF e marcadores oxidativos o que é eficaz no fenômeno inflamatório da endometriose ratificando às outras pesquisas.

## **Conclusão**

Os achados dessa revisão de escopo mostram um número escasso de estudos experimentais relacionados ao uso da talidomida no manejo da dor em endometriose o que configura uma limitação desta pesquisa. Contudo, ficou comprovada a atividade antiangiogênica e anti-inflamatória do fármaco, o que pode ser opção a ser utilizada como tratamento de dor.

Nota-se, entretanto, pouca informação acerca do uso a longo prazo e uma ausência de padronização das doses, o que dificulta a criação de um protocolo para o uso dessa medicação

nos modelos experimentais. Assim, sugere-se a realização de mais pesquisas com esse caráter, a fim de aprimorar e complementar as evidências científicas e permitir o uso terapêutico da talidomida no alívio da dor.

### Referências

1. Azimirad A, Alborzi S, Kumar PV, Zolghadri J, Zarei A, Tavana Z, et al. Thalidomide affects experimental endometriosis: a randomized controlled study in the rat. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(8):1989-1997. Doi: 10.1111/jog.12434.
2. Chen F-Y, Wang X, Tang R-Y, Guo Z-X, Deng Y-Z-J, Yu Q. New therapeutic approaches for endometriosis besides hormonal therapy. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(24):2984-2993. Doi: 10.1097/CM9.0000000000000569.
3. Valerio FP. Influência da doxiciclina em endometriose experimentalmente induzida em ratas [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018 [cited 2023 jul 13]. doi:10.11606/D.17.2018.tde-19072018-115724.
4. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Endometriose. Protocolo Febrasgo Ginecologia. 2021 [cited 2023 jul 13];(78):1-16. Disponível em: <https://sogirgs.org.br/area-do-associado/Endometriose-2021.pdf>.
5. Antônio LGL, Rosa-e-Silva JC, Machado DJ, Westin AT, Garcia SB, et al. Thalidomide reduces cell proliferation in endometriosis experimentally induced in rats. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2019;41(11):668-672. Doi: 10.1055/s-0039-3399551.
6. Maddern J, Grundy L, Castro J, Brierley SM. Pain in endometriosis. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:590823. Doi: 10.3389/fncel.2020.590823.
7. Gruber TM, Mechsner S. Pathogenesis of endometriosis: the origin of pain and subfertility. *Cells.* 2021;10(6):1381. Doi: 10.3390/cells10061381.
8. Silva HM, Melo HCS. Talidomida: aspectos históricos e atuais de seu uso no Brasil. *Rev Saúde Educ.* 2018;3(1):109-23.
9. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien K, Colquhoun H, Kastner M, et al. A scoping review on the conduct and reporting of scoping reviews. *BMC Med Res Methodol.* 2016;16:15. Doi: 10.1186/s12874-016-0116-4.
10. Peters MDJ, Godfrey C, McInerney P, Munn Z, Tricco AC, Khalil H. Scoping reviews. In: Aromataris E, Munn Z, editors. *JBÍ manual for evidence synthesis.* Adelaide: JBI; 2020.

11. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D, et al. PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. *Ann Intern Med.* 2018;169(7):467-473. Doi: 10.7326/M18-0850.
12. McGowan J, Straus S, Moher D, Langlois EV, O'Brien KK, Horsley T, et al. Reporting scoping reviews-PRISMA ScR extension. *J Clin Epidemiol.* 2020;123:177-179. Doi: 10.1016/j.jclinepi.2020.03.016.
13. Bakacak M, Ercan Ö, Köstü B, Bostancı MS, İnanç F, Yaylalı A, et al. The effects of thalidomide in a rat model of surgically-induced endometriosis. *Turk J Obstet Gynecol.* 2015;12(3):125-131. Doi: 10.4274/tjod.71601.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo foi pioneiro em utilizar testes comportamentais como o Rota Rod, Von Frey e Escala de Faces na utilização de várias dosagens de talidomida como proposta para o controle da dor provocado pela endometriose. Constatou-se que o fármaco é eficaz no controle algico em doses acima de 50mg/kg. No teste comportamental de avaliação da face das ratas com a Rat Grime Scale, confirmou-se que a partir do 14º dia de aplicação do protocolo uma melhora do quadro algico. Vale ressaltar que o grupo com a menor dose de talidomida, demonstrou efetividade clínica no tratamento da dor em menor intensidade em comparação ao grupo T50mg e T100mg, os quais ao final do protocolo conseguiram zerar o escore na escala junto ao grupo leuprolida. Ratificando o resultado de outros estudos, observa-se que quanto maior dose de talidomida melhor a eficácia no tratamento da endometriose (ANTÔNIO *et al.*, 2019; AZIMIRAD *et al.*, 2014; BAKACAK *et al.*, 2015).

Modelos experimentais como de Guo e Hu (2017) obtiveram resultados similares ao presente estudo ao avaliaram a dor por meio da escala de face em ratos pós-laparotomia simples após administração única de talidomida nas doses de 20mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia, por via intraperitoneal. Como resultado houve uma redução significativa de dor aguda pós-operatória e também inibição da produção das citocinas TNF-alfa e IL-1 $\beta$  dosadas no décimo quarto dia pós-operatório.

No modelo experimental adotado no presente estudo, a dose máxima administrada nos protocolos foi de 100mg/kg/dia. Em humanos doses acima de 100mg/dia são mais relacionadas a reações adversas como a neuropatia. A incidência desta complicação depende da dose adotada diariamente bem como o tempo de tratamento. É considerada a complicação mais grave, sendo relatada em 1-30% dos pacientes com mieloma em uso de talidomida. Habitualmente está ligada ao uso prolongado do fármaco (mais de 6 meses) e com doses cumulativas maiores que 50 mg/dia. A maioria dos pacientes tem reações adversas reversíveis, se recuperando espontaneamente após a retirada da medicação. Contudo, a neuropatia pode ser irreversível se o uso do fármaco não for descontinuado (KUMAR *et al.*, 2017; MUJAGIĆ; CHABNER; MUJAGIĆ, 2002; RAZA; SAFYAN; SUZANNE, 2017).

Não foi possível identificar limitações na marcha das ratas, pois mesmo o grupo controle demonstrou no pior quadro algico apenas uma claudicação leve e os demais grupos não apresentaram alteração de marcha do início ao fim do protocolo. Trata-se de um teste subjetivo, portanto não há uma padronização quanto as medidas desta escala, sendo sua mensuração individualizada para cada objeto de teste. Contudo, vários estudos adotam este teste para

avaliação de dor como padrão para análise de quadros álgicos semelhantes (MORAIS *et al.*, 2023; VASCONCELOS *et al.*, 2021).

Observou-se melhora na alodinia mecânica, com importante eficácia da talidomida com doses a partir de 50mg/kg/dia, resultados também observados na escala de face. A performance da dose de 50mg assemelha-se ao efeito obtido com a leuprolida. A dose de 100mg de talidomida foi a que obteve maior tolerabilidade a dor, indicando que esta seria a melhor escolha para o manejo dos quadros álgicos. Pesquisas realizadas com modelos experimentais em ratas consideram doses de 100mg/kg/dia como ideal para o tratamento da endometriose, confirmando o resultado desse estudo (BAKACAK *et al.*, 2015; LOGU *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2023).

As ratas tratadas com doses de 50 e 100mg/kg/dia obtiveram sensibilidade a dor com o monofilamento acima de 7 gramas no teste. Pesquisas confirmam a leuprolida como um bom modelo para controle dos quadros inflamatórios na endometriose em humanos, entretanto, observa-se no presente estudo que a talidomida em doses acima de 50 mg tem eficácia igual ou superior a leuprolida, sugerindo um melhor modelo farmacológico aplicado ao controle de dor (BAKACAK *et al.*, 2015; MUJAGIĆ; CHABNER; MUJAGIĆ, 2002; SWAYZER; GERRIETS, 2023).

Um estudo realizado por Choi *et al.* (2010) evidenciou melhora da alodinia mecânica em ratas com dor neuropática tratadas com talidomida nas doses de 12,5mg/kg/dia, 25mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia por via intraperitoneal. Já Huang *et al.* (2014), utilizou a dose de 50mg/kg/dia de talidomida intraperitoneal, atenuando fortemente a alodinia mecânica em um modelo animal de neuropatia diabética tipo 1 induzida pela estreptozotocina. Ambos os estudos citados concordam que a dose de 50mg/kg/dia seria ideal para o controle álgico, corroborando com o modelo experimental adotado nesta pesquisa, que identificou doses acima de 50 mg/kg/dia como mais efetivas no tratamento da dor na endometriose.

A capacidade de redução da hiperalgesia e/ou alodinia mecânica pela talidomida também já foi demonstrada em diversos modelos tanto de dor inflamatória, quanto de dor neuropática. Rocha *et al.* (2006) perceberam que a talidomida na dose única de 30mg/kg, via subcutânea, diminuiu notavelmente as respostas inflamatórias e nociceptivas causadas pela carragenina quando aplicada em patas de camundongos, reduzindo o edema, a alodinia mecânica e a migração de neutrófilos, provavelmente devido inibição de vias relacionadas ao TNF -alfa. A análise desses dados, em conjunto com os resultados do atual estudo, evidencia os efeitos analgésicos da talidomida em quadros dolorosos de naturezas inflamatória, nociceptiva envolvidas na patogênese da dor relacionada à endometriose.

É notório o impacto da talidomida sobre os limiares de dor na aplicação dos testes nociceptivos desta pesquisa. Um estudo realizado por Xu *et al.* (2019) comprovaram o alívio de dor neuropática em ratas a partir de tratamento com talidomida na dose de 20mg/kg/dia tratados por 14 dias. Os resultados obtidos foram a inibição da ativação de astrócitos e células da micróglia, assim como a infra-regulação dos níveis de TNF-alfa na medula espinhal.

Não há na literatura um real entendimento sobre o mecanismo de ação da talidomida. Há relatos apenas das propriedades anti-inflamatórias baseadas em efeitos sobre citocinas e quimiocinas responsáveis por manter o processo inflamatório. Nesta pesquisa observou-se níveis mínimos de TNF $\alpha$  nos grupos tratados com talidomida durante todo o período testado, corroborando com o estudo de Azimirad *et al.* (2014) que evidenciaram o efeito antiproliferativo e antiangiogênico da talidomida em ensaio clínico, utilizando o fármaco na dose de 22mg/kg/dia e resultando na manutenção de baixos níveis de TNF-alfa, IL-6 e contagem do número de leucócitos no fluido peritoneal de ratas com endometriose induzida em relação a um grupo controle.

Uma alteração que chamou atenção no D21 foi o aumento de TNF- $\alpha$  no grupo leuprolida, visto que o início da sua ação ocorre a partir de 2 a 4 semanas mantendo sua eficácia de 3 a 6 meses. A leuprolida não possui ação direta no controle algico por se tratar de uma hormonioterapia que controla a fisiopatologia da endometriose, posteriormente impactando no controle da dor. Já a talidomida torna-se superior no controle algico por seu rápido início de ação e sua manutenção dos baixos níveis de fatores inflamatórios durante todo o seu período de administração (SWAYZER; GERRIETS, 2023; WILSON *et al.*; XU *et al.*, 2019).

Por se tratar de uma inflamação de fase aguda, os baixos níveis de TNF $\alpha$  não impactaram grandes alterações nas quantidades séricas de IL6. Ressalta-se que a secreção do TNF $\alpha$  está diretamente relacionada com a produção de IL6, ratificando com os resultados de outros estudos que conseguiram realizar a manutenção dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, prevenindo a evolução das crises algicas associadas a uma doença de base (AZIMIRAD *et al.*, 2014; NASCIMENTO; FOLCHINI; KOWACS, 2017; TEO; STIRLING; ZELDIS, 2005).

Por se tratar de uma citocina que possui maior atividade na fase crônica da dor, observou-se níveis de IFN- $\gamma$  muito próximos entre os grupos tratados e o grupo saudável. Vale ressaltar que houve um aumento desta citocina no grupo controle no D7 e está relacionada com a resposta imune adaptativa, mantendo pouca influência no processo nociceptivo na fase inicial. Portanto, o aumento desta é evidenciado durante o recrutamento de células do sistema imune relacionadas com a organização dentro do processo inflamatório na fase crônica da doença e está fortemente associada com a cronificação das crises algicas e também a fatores que

convergem com a dor neuropática (KAWAMATA *et al.*, 2006; MIGUEL, 2013; TSAI *et al.*, 2018).

A IL10, dentre os grupos das interleucinas, é responsável pelo controle de quadros inflamatórios, imunossuprimindo células e outras citocinas responsáveis por quadros agudos. Neste estudo observa-se que o controle apresentou elevados níveis de IL10, devido ao quadro agudo da endometriose e a grande quantidade de fatores inflamatórios, ratificando uma resposta de fase aguda.

No D21 observa-se que no grupo controle houve uma queda abrupta dos níveis de IL10, confirmando a evolução do quadro clínico da doença, o que se correlaciona com os testes comportamentais. No grupo da menor dose de talidomida observou-se ainda um aumento nos níveis de IL10, indicando que esta dose diferente das demais não interferiu no processo inflamatório de forma efetiva. Estudos como o de Mancini *et al.* (2018) mostram que a endometriose após tratada traz uma regressão nos níveis de IL10, indicando melhora até mesmo na fase crônica da doença.

De acordo com os testes comportamentais, podemos observar que a dose de 50mg/kg/dia teria um efeito ideal ou próximo do ideal para controle da dor quando comparado com as demais doses. A dose de 25mg/kg/dia não foi eficiente para a melhora do quadro algico e na literatura já se observa uma alta frequência de toxicidade e de reações adversas relacionadas com doses iguais ou acima de 100mg/kg de talidomida. Para um melhor impacto do medicamento nos marcadores inflamatórios, seria necessário maior tempo de exposição as doses recomendadas pelo protocolo do presente estudo, já que tratamentos como a leuprolida necessitariam minimamente de 28 dias para uma resposta efetiva no controle dos marcadores inflamatórios (HURST *et al.*, 2000; MUJAGIĆ; CHABNER; MUJAGIĆ, 2002; SWAYZER; GERRIETS, 2023; WILSON *et al.*, 2007).

Na análise volumétrica dos implantes, pode-se constatar que o grupo controle foi o único que teve aumento do volume de lesão, corroborando com o resultado de outros estudos onde os grupos tratados com placebo tiveram um aumento da lesão endometriótica. Os grupos tratados com talidomida e leuprolida obtiveram redução da lesão conforme o protocolo experimental. Todavia, apenas concentrações acima de 50mg e o leuprolida mostraram-se clinicamente efetivos (ANTÔNIO *et al.*, 2019; AZIMIRAD *et al.*, 2014; BAKACAK *et al.*, 2015; BULUN, 2009).

Seguindo esta linha outros estudos foram conduzidos, como em 2015 por Bakacak *et al.* (2015) que compararam um grupo tratado com 100 mg/kg/dia de talidomida via oral com um grupo controle gavado com 0,5ml de salina/dia, durante 2 semanas. O volume médio dos

implantes e os escores histopatológicos diminuíram significativamente no grupo tratado com talidomida quando comparado ao controle. Outra pesquisa desenvolvida por Azimirad *et al.* (2014), que após indução da endometriose comparou 2 grupos de ratas: um grupo talidomida (n = 9; 22 mg/dia; via oral) e um grupo controle (n = 9; 0,5mL de solução salina 0,9%/dia; via oral) obtendo redução significativa dos escores histopatológicos em comparação ao grupo controle.

Antônio *et al.* (2019) mostraram que o tratamento intraperitoneal de talidomida tanto na dose de 10mg/kg/dia quanto na dose de 1mg/kg/dia, por 10 dias, reduziram significativamente a área de lesão e do índice de proliferação celular dos implantes endometrióticos, além de não mostrarem diferença significativa entre si.

A principal limitação observada nesta pesquisa foi o período de tratamento em três semanas, pois o efeito do controle positivo é mais efetivo entre 3 e 6 semanas onde observa-se o ápice da ação anti-inflamatória da leuprolida. Vale ressaltar que a talidomida parece ser mais eficaz conforme a continuidade do tratamento, ou seja, em terapias com maior duração. Seria interessante um modelo para estudo em até 6 semanas para melhor avaliação e comparação do uso da leuprolida com a talidomida, bem com a inclusão de um maior número de citocinas e mediadores envolvidos no processo inflamatório e com mais influência no processo nociceptivo.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi observado resultados positivos com o uso da talidomida no controle da dor, na dosagem de citocinas, na análise da evolução macroscópica e histológica em um modelo experimental de endometriose em ratas.

A talidomida teve uma ação mais eficaz com doses a partir de 50mg/kg/dia, reduzindo o limiar de dor apresentado nos testes comportamentais aplicados. O efeito analgésico deste fármaco é confirmado através da manutenção de baixas doses TNF e IL6 além de uma redução da expressão de IL10 nos grupos T50 e T100, ratificando a melhor resposta nesses grupos.

A partir da dose de 50mg/kg/dia de talidomida foi possível observar uma significativa redução volumétrica dos implantes ao final do tratamento semelhante ao acetado de leuprolida. Foi visto também comprometimento do revestimento epitelial ectópico nos grupos tratados nas doses de 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia com talidomida igualando-se ao grupo leuprolida.

De acordo com a pesquisa, as doses acima de 50mg/kg/dia foram efetivas para o tratamento da dor na endometriose em ratas, podendo tornar-se uma opção no tratamento dos quadros algícas causados pela doença.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, L. *et al.* Psychosocial impact of endometriosis: from co-morbidity to intervention. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, Amsterdam, v. 50, p. 2-10, 2018.
- ALIMI, Y. *et al.* The clinical anatomy of endometriosis: a review. **Cureus**, Palo Alto, v. 10, n. 9, p. e3361, 2018.
- ALTINBAS, S. K. *et al.* Is montelukast effective in regression of endometrial implants in an experimentally induced endometriosis model in rats? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 184, p. 7-12, 2015.
- ALVES, J. E. de O. *et al.* Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, Santo Antônio de Pádua, v. 8, n. 1, p. 56-68, 2017.
- ANDRES, M. P. *et al.* O tratamento hormonal como terapia de primeira linha é seguro e melhora a dor pélvica em mulheres com endometriose intestinal. **Einstein**, São Paulo, v. 17, n. 6, p. 1-6, 2019.
- ANDRES, M. P.; BORRELLI, G. M.; ABRÃO, M. S. Endometriosis classification according to pain symptoms: can the ASRM classification be improved? **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 51, p. 111-118, 2018.
- ANTÔNIO, L. G. L. *et al.* Thalidomide Reduces Cell Proliferation in Endometriosis Experimentally Induced in Rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 11, p. 668-672, 2019.
- AREDO, J. V. *et al.* Relating chronic pelvic pain and endometriosis to signs of sensitization and myofascial pain and dysfunction. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 35, n. 1, p. 88-97, 2017.
- ARRIETA, O. *et al.* Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 99-104, 2002.
- AZIMIRAD, A. *et al.* Thalidomide affects experimental endometriosis: a randomized controlled study in the rat. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 40, n. 8, p. 1989-1997, 2014.
- BAKACAK, M. *et al.* The Effects of Thalidomide in a Rat Model of Surgically Induced Endometriosis. **Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology**, Fındıkzade-İstanbul, v. 12, n. 3, p. 125-131, 2015.
- BERALDO, F. B. *et al.* Surgical treatment of intestinal endometriosis: outcomes of three different techniques. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 7, p. 390-396, 2018.

BESSMERTNY, O.; PHAM, T. Thalidomide use in 57 pediatric patients. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 36, n. 3, p. 521-525, 2002.

BRUNER-TRAN, K. L. *et al.* Rodent models of experimental endometriosis: identifying mechanisms of disease and therapeutic targets. **Current Women's Health Reviews**, Saif Zone, v. 14, n. 2, p. 173-188, 2018.

BULUN, S. E. *et al.* Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 28, n. 1, p. 36-43, 2010.

BULUN, S. E. Mechanisms of disease endometriosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.360, n. 3, p. 268-279, 2009.

CAMPOS, F. T. *et al.* Controle e utilização da talidomida: adequados à ampliação do uso e mitigação do risco de teratogenicidade no Brasil? **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 9, p. 4233-4242, 2021.

CAVKAYTAR, S. *et al.* Clarithromycin regresses endometriotic implants in rat endometriosis model. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Bristol, v. 35, n. 8, p. 844-847, 2015.

CELIK, O. *et al.* Disulfiram, as a candidate NF- $\kappa$ B and proteasome inhibitor, prevents endometriotic implant growing in a rat model of endometriosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 20, p. 4380-4389, 2016.

CHOI, J. I. *et al.* Antiallodynic effect of thalidomide and morphine on rat spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. **The Korean Journal of Pain**, Seoul, v. 23, n. 3, p. 172-178, 2010.

COHEN, S.; BETHS, T. Grimace scores: tools to support the identification of pain in mammals used in research. **Animals**, Basel, v. 10, n. 10, p. 1726, 2020.

COOK, K. M.; FIGG, W. D. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. **A Cancer Journal for Clinicians**, New York, v. 60, n. 4, p. 222-243, 2010.

COSTA, A. J. S.; MEJIA, D. P. M. **Atuação da acupuntura no tratamento da endometriose: revisão de literatura**. 2018. 12 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Acupuntura) – Faculdade Ávila, Goiânia, 2018. Disponível em: <https://silo.tips/download/atuaao-da-acupuntura-no-tratamento-da-endometriose-revisao-de-literatura>. Acesso em: 27 set. 2022.

D'AMATO, R. J. *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 91, n. 9, p. 4082-4085, 1994.

DESCOVICH, K. A. *et al.* Facial expression: An under-utilised tool for the assessment of welfare in mammals. **Altex**, Heidelberg, v. 34, n. 3, p. 409–429, 2017.

DIAMANTI, A. *et al.* The clinical implications of thalidomide in inflammatory bowel diseases. **Expert Review of Clinical Immunology**, London, v. 11, n. 6, p. 1-10, 2015.

DINIZ, T. M.; LEAL, S. C.; KLIER, A. H. Talidomida: aspectos químicos e Tecnológicos. **Centro Universitário Newton Paiva**, Belo Horizonte, v. 1, n. 10, p. 74 - 81, jul. 2015.

DUNSELMAN, G. A. *et al.* ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 400-412, 2014.

ERCAN, C. M. *et al.* Comparison of efficacy of bromocriptine and cabergoline to GnRH agonist in a rat endometriosis model. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, München, v. 291, n. 5, p. 1103-1111, 2014.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **Endometriose**. São Paulo: FEBRASGO, 2021. (Protocolo FEBRASGO-Ginecologia, 78).

FOTI, P. V. *et al.* Endometriosis: clinical features, MR imaging findings and pathologic correlation. **Insights Into Imaging**, Berlin, v. 9, n. 2, p. 149-172, 2018.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, London, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

GALLAGHER, J. S. *et al.* Long-term effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and add-back in adolescent endometriosis. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 376-381, 2018.

GIUDICE, L. C. Clinical practice. Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 362, n. 25, p. 2389-2398, 2010.

GOKTOLGA, U. *et al.* Effect of the non-specific matrix metalloproteinase inhibitor Doxycycline on endometriotic implants in an experimental rat model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens, v. 9, n. 5, p. 1813-1818, 2015.

GREENE, A. D. *et al.* Endometriosis: where are we and where are we going? **Reproduction**, Cambridge, v. 152, n. 3, p. 63-68, 2016.

GUO, P.; HU, S. P. Thalidomide alleviates postoperative pain and spatial memory deficit in aged rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 95, p. 583-588, 2017.

GUO, S. W.; EVERS, J. L. H. Lack of transparency in clinical trials. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 121, n. 6, p. 1281-1290, 2013.

HENEY, D. *et al.* Thalidomide treatment for chronic graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 78, n. 1, p.23-27, 1991.

HIRSCH, M. *et al.* Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and metanalysis. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 123, n. 11, p. 1761-1768, 2016.

HUANG, Y. *et al.* The role of TNF-alpha/NF-kappa B pathway on the up-regulation of voltage-gated sodium channel Nav1.7 in DRG neurons of rats with diabetic neuropathy. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 75, p. 112-119, 2014.

HURST, B. S. *et al.* Delayed oral estradiol combined with leuprolide increases endometriosis-related pain. **JSLs: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, Miami, v. 4, n. 2, p. 97-101, 2000.

INTERNATIONAL WORKING GROUP OF AAGL *et al.* An international terminology for endometriosis. **Facts, views & vision in ObGyn**, St-Niklaas, v. 13, n. 4, p. 295-304, 2021.

IVERSEN, M. L.; SEYER-HANSEN, M.; FORMAN, A. Does surgery for deep infiltrating bowel endometriosis improve fertility? A review. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 96, n. 6, p. 688-693, 2017.

JANSEN, J. R.; CODDINGTON, C. C. Evolving spectrum: the pathogenesis of endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 53, n. 2, p. 379-388, 2010.

JONES, R. C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist (Wy-40, 972), levonorgestrel, danazol, and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. **Acta Endocrinologica**, Copenhagen, v. 106, p. 282-288, 1984.

JOSEPH, S.; MAHALE, S. D. Endometriosis knowledgebase: a gene-based resource on endometriosis. **Database**, Oxford, v. 2019, p. 1-9, 2019.

JUNG, Y. J. *et al.* Neuroinflammation as a factor of neurodegenerative disease: thalidomide analogs as treatments. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 7, n. 313, p. 7, 2019.

KALFF, A.; DOWSING, C.; GRIGG, A. The impact of a regular erythrocytapheresis programme on the acute and chronic complications of sickle cell disease in adults. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 149, n. 5, p. 768-774, 2010.

KAWAMATA, A. *et al.* Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. **Oncology Reports**, Athens, v. 16, n. 6, p. 1231-1236, 2006.

KEENAN, J. A. *et al.* Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, n. 1, p. 135-141, 1999.

KIRCHMAIR, R. *et al.* Therapeutic angiogenesis inhibits or rescues chemotherapy-induced peripheral neuropathy: taxol- and thalidomide-induced injury of vasa nervorum is ameliorated by VEGF. **Molecular Therapy**, San Diego, v. 15, n. 1, p. 69-75, 2007.

- KRAYCHETE, D. C. *et al.* Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 58, n. 5, p. 492-505, 2008.
- KUMAR, S. K. *et al.* Treating multiple myeloma patients with oral therapies. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, Dallas, v. 17, n. 5, p. 243-251, 2017.
- KUMAR, S.; RAJKUMAR, S. V. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1612-1622, 2006.
- LAGANÀ, A. S. *et al.* Unus pro omnibus, omnes pro uno: A novel, evidence-based, unifying theory for the pathogenesis of endometriosis. **Medical Hypotheses**, New York, v. 103, p. 10-20, 2017.
- LEANDRO, J. A.; SANTOS, F. L. História da Talidomida no Brasil apartir da mídia impressa (1959-1962). **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 991-1005, set. 2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-12902015000300991&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902015000300991&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 8 maio 2021.
- LIU, J. H. Endometriosis. In: MANUAL MSD: versão para profissionais de saúde. [S. l.]: Merk, 2017.
- LIU, Y. *et al.* Peritoneal fluid of patients with endometriosis promotes proliferation of endometrial stromal cells and induces COX-2 expression. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 5, p. 1836-1838, 2011.
- LOGU, F. de *et al.* Oxidative stress mediates thalidomide-induced pain by targeting peripheral TRPA1 and central TRPV4. **BMC Biology**, London, v. 18, n. 1, p. 197, 2020.
- MAJUMDER, S. *et al.* TNF  $\alpha$ ; signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF-  $\alpha$ ; signaling under thalidomide. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 12, n. 13, p. 1456-1467, 2012.
- MALVEZZI, H. *et al.* Endometriosis: current challenges in modeling a multifactorial disease of unknown etiology. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 18, n. 1, p. 311, 2020.
- MANCINI, F. *et al.* Low-dose SKA Progesterone and Interleukin-10 modulate the inflammatory pathway in endometriotic cell lines. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 55, p. 223-230, 2018.
- MARQUI, A. B. T. Evaluation of endometriosis-associated pain and influence of conventional treatment: a systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 61, n. 6, p. 507-518, 2015.
- MARSOL, I. B. Indicaciones de talidomida y sus derivados en dermatologia. **Piel. Formación continuada en Dermatología**, [S. l.], v. 28, n. 10, p. 606-613, 2013.
- MARUOTTI, N.; CANTATORE, F. P.; RIBATTI, D. Thalidomide in treatment of connective diseases and vasculitis. **Reumatismo**, Milan, v. 58, n. 3, p. 187-190, 2006.

MCFARLANE, M. *et al.* Emerging role of thalidomide in the treatment of gastrointestinal bleeding. **Frontline Gastroenterol**, London, v. 9, n. 2, p. 98-104, 2018.

MCLENNAN, K. J. A. Why pain is still a welfare issue for farm animals, and how facial expression could be the answer. **Agriculture**, Bases, v. 8, n. 8, p. 127, 2018.

MENDES, C.; MACHADO, D.; LINARTEVICH, V. Índice de dor neuropática em pacientes oncológicos e conduta farmacológica. **Fag Journal of Health**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 424-428, 2020.

MIGUEL, M. **Aspectos imunológicos de pacientes com dor crônica**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. **Laboratory Animals**, London, v. 50, n. 4, p. 305-307, 2016.

MONTENEGRO, M. L. *et al.* Physical therapy in the management of women with chronic pelvic pain. **International Journal of Clinical Practice**, Esher, v. 62, n. 2, p. 263-269, 2008.

MORAIS, S. V. D. *et al.* Cuminaldehyde Effects in a MIA-Induced Experimental Model Osteoarthritis in Rat Knees. **Metabolites**, Basel, v. 13, n. 3, p. 397, 2023.

MORAIS, S. V. de *et al.* Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 765773, nov. 2016.

MORO, A.; INVERNIZZI, N. A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e a melhoria da regulamentação farmacêutica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 603-622, set. 2017. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-59702017000300603&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702017000300603&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 8 maio 2021.

MOTZER, R. J. *et al.* Phase II trial of thalidomide for patients with advanced renal cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 20, n. 1, p. 302-306, 2002.

MOWERS, E. L. *et al.* Prevalence of endometriosis during abdominal or laparoscopic hysterectomy for chronic pelvic pain. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v. 127, n. 6, p. 1045-1053, 2016.

MUJAGIĆ, H.; CHABNER, B. A.; MUJAGIĆ, Z. Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v. 43, n. 3, p. 274-285, 2002.

NÁLCUL, A. P.; SPRITZER, P. M. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6 p. 298-307, 2010.

NASCIMENTO, C. S. L. **Psicopatologia e qualidade de vida na endometriose**. 2017. 146 f. Tese (Doutorado em Psicologia) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2017.

NASCIMENTO, F. A.; FOLCHINI, C.; KOWACS, P. A. Potential role of thalidomide in the management of chronic pelvic pain: cases report. **Revista Dor**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 181-183, 2017.

NEVES, S. M. P. *et al.* **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NOGUEIRA NETO, J. *et al.* Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 205-208, 2011.

ONALAN, G. *et al.* Effects of amifostine on endometriosis, comparison with Nacetyl cysteine, and leuprolide as a new treatment alternative: a randomized controlled trial. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 289, n. 1, p. 193-200, 2014.

PACHECO, C. R. C. *et al.* Mieloma múltiplo: o subdiagnóstico em indivíduos idosos com queixas osteomusculares. **Revista de Saúde**, Vassouras, v. 13, n. 1, p. 2-5, 2022.

PARASAR, P.; OZCAN, P.; TERRY, K. L. Endometriosis: epidemiology, diagnosis and clinical management. **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, Hoboken, v. 6, n. 1, p. 34-41, 2017.

PATT, Y. Z. *et al.* Thalidomide in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma: a phase II trial. **Cancer**, New York, v. 103, n. 4, p. 749-755, 2005.

PODGAEC, S. **Endometriose**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

PODGAEC, S. *et al.* **Endometriose**. São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, 2018. (Protocolo FEBRASGO – Ginecologia, 32).

QUEREDA, F.; BARROSO, J.; ACIEN, P. Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rats. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 35-40, 1996.

RAFIQUE, S.; DECHERNEY, A. H. Medical management of endometriosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 60, n. 3, p. 485-496, 2017.

RAJKUMAR, S. V. Multiple myeloma: every year a new standard? **Hematological Oncology**, Oxford, v. 37, p. 62-65, 2019. Supplement 1.

RAJKUMAR, S. V. Thalidomide in multiple myeloma. **Oncology**, Cranbury, v. 14, n. 12, p. 11-16, 2000.

RAZA, S.; SAFYAN, R.; SUZANNE, L. Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in multiple myeloma. **Current Cancer Drug Targets**, Hilversum, v. 17, n. 999, p. 1-1, 2017.

ROCHA, A. C. C. *et al.* Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 148, n. 5, p. 688-695, 2006.

SAKATA, M. *et al.* Effects of danazol, gonadotropin releasing hormone agonist, and a combination of danazol and gonadotropin, releasing hormone agonist on experimental endometriosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 163, n. 5, p. 1679-1684, 1990.

SALOMÉ, D. G. M. *et al.* Endometriose: epidemiologia nacional dos últimos 5 anos. **Revista de Saúde**, Vassouras, v. 11, n. 2, p. 39-43, 2020.

SANTOS, D. B. *et al.* **Uma abordagem integrada da endometriose**. Cruz das Almas/BA: UFRB, 2012.

SIKORA, J. *et al.* Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation— The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 77, n. 4, 2017.

SILVA, A. C. **Estudo da osteoartrose em joelhos de cães secundária à ruptura do ligamento cruzado cranial**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, H. M.; MELO, H. C. S. Talidomida: aspectos históricos e atuais de seu uso no Brasil. **Revista Saúde e Educação**, Coromandel, v. 3, n. 1, p. 109-123, jan./jun. 2018.

SILVA, I. D. C. *et al.* Aspectos fisiopatológicos, diagnósticos e terapêuticos da endometriose na atenção farmacêutica: um estudo de revisão. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 6, n. 1, p.99-108, jan./abr. 2013.

SIMSEK, Y. *et al.* Atorvastatin exerts anti-nociceptive activity and decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor- $\alpha$  in a rat endometriosis model. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 290, n. 5, p. 999-11006, 2014.

SOTOCINA, S. G. *et al.* The rat grimace scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular Pain**, London, v. 7, p. 1744-8069-7-55, 2011.

STORY, L.; KENNEDY, S. Animal studies in endometriosis: a review. **ILAR Journal**, Washington, DC, v. 45, n. 2, p. 132-138, 2004.

STRUPP, C. *et al.* Thalidomide for the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, Baltimore, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2002.

SWAYZER, D. V.; GERRIETS, V. Leuprolide. *In*: STATPEARLS. **Point of care and clinical support tool**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 7 Oct. 2023. Disponível em: <https://www.statpearls.com/point-of-care/24223#:~:text=Leuprolide%20Prostap%20SR,advanced%20prostate%20cancer>. Acesso em: 10 out. 2023.

- TAPPE-THEODOR, A.; KING, T.; MORGAN, M. M. Pros and cons of clinically relevant methods to assess pain in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 100, p. 335-343, 2019.
- TEKIN, Y. B. Is resveratrol a potential substitute for leuprolide acetate in experimental endometriosis? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 184, p. 1-6, 2015.
- TEO, S. K.; STIRLING, D. I.; ZELDIS, J. B. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 107-114, 2005.
- THEOH, P. J.; CHNG, W. J. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: More room for improvement. **Blood Cancer Journal**, New York, v. 11, n. 4, p. 1-18, 2021.
- TOKUSHIGE, N. *et al.* Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 88, n. 4, p. 795-803, 2007.
- TOKUSHIGE, N. *et al.* Nerve fibres in peritoneal endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 11, p. 3001-3007, 2006.
- TOMASSETTI, C.; D'HOOGE, T. Endometriosis and infertility: Insights into the causal link and management strategies. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 51, p. 25-33, 2018.
- TSAI, Y. R. *et al.* Pomalidomide ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury and cell death in rat primary cortical neuronal cultures by inducing anti-oxidative and antiapoptosis effects. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 10, p. 3252, 2018.
- UHL, K. *et al.* Thalidomide use in the US: experience with pregnancy testing in the STEPS programme. **Drug Safety**, Auckland, v. 29, n. 4, p. 321-329, 2006.
- VALLET, S. *et al.* Thalidomide and lenalidomide: mechanism-based potential drug combinations. **Leuk Lymphoma**, Philadelphia, v. 49, n. 7, p. 1238-1245, 2008.
- VASCONCELOS, C. C. *et al.* Frações de *Arrabidaea chica* Verlot reduzem a progressão da osteoartrite induzida por MIA em joelhos de ratos. **Inflammopharmacol**, [S. l.], v. 29, p. 735-752, 2021.
- VERCELLINI, P. *et al.* Waiting for Godot: a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 3-13, 2011.
- VERNON, M. W.; WILSON, E. A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. **Fertility and Sterility**, New York, v. 44, n. 5, p. 684-694, 1985.
- VETVICKA, V. *et al.* Regulation of apoptotic pathways during endometriosis: From the molecular basis to the future perspectives. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, München, v. 294, n. 5, p. 897-904, 2016.

VIANNA, F. S. L. **Talidomida no Brasil: vigilância epidemiológica, teratogênese e farmacogenética**. 2013. 174 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

VOGELSANG, G. B. *et al.* Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease. **The New England journal of Medicine**, Boston, v. 326, n. 16, p. 1055-1058, 1992.

WANG, W. *et al.* Endometriosis fertility index score maybe more accurate for predicting the outcomes of in vitro fertilisation than r-AFS classification in women with endometriosis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 11, p. 112, 2013.

WILSON, A. C. *et al.* Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, London, v. 16, n. 11, p. 1851-1863, 2007.

XU, H. *et al.* Systemic injection of thalidomide prevent and attenuate neuropathic pain and alleviate neuroinflammatory response in the spinal dorsal horn. **Journal of Pain Research**, Auckland, v. 12, p. 3221-3230, 2019.

XU, Y. *et al.* Effects of acupuncture for the treatment of endometriosis-related pain: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 10, p. e0186616, 2017.

YAGYU, T. *et al.* Thalidomide inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Springfield, v. 90, n. 5, p. 3017-3021, 2005.

ZELDIS, J. B. *et al.* STEPS: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 21, n. 2, p. 319-330, 1999.

ZONDERVAN, K. T. *et al.* Endometriosis. **Nature Reviews. Disease Primers**, London, v. 4, n. 1, p. 9, 2018.

ZONDERVAN, K. T.; BECKER, C. M.; MISSMER, S. A. Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 382, n. 13, p. 1244-1256, 2020.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – PROTOCOLO EXPERIMENTAL FOI APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)/UFMA

|                                                                                   |                                                                                                                            |                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b><br><b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b><br><b>CIAEP: 01.0341.2014</b> | <br><small>Comissão de Ética no Uso de Animais</small> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DA TALIDOMIDA NA ENDOMETRIOSE EXPERIMENTAL"**, Processo nº **23115.016944/2019-25**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Batista Santos Garcia**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 31/05/2019.

We certify that the proposal: **"ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THALIDOMIDE IN EXPERIMENTAL ENDOMETRIOSIS"**, Process n. **23115.016944/2019-25**, under the responsibility of **Prof. Dr. João Batista Santos Garcia**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 05/31/2019.

**Finalidade da Proposta:** Pesquisa

**Área:** Ciências da Saúde

**Vigência da Proposta: 13/09/2019 a 31/08/2020.**

|                |                                       |        |         |         |             |
|----------------|---------------------------------------|--------|---------|---------|-------------|
| Origem:        | Biotério Central da UFMA              | Idade: | 2 meses | Amostra | 60          |
| Espécie:       | Ratos<br>( <i>Rattus norvegicus</i> ) | Sexo:  | Fêmeas  | Peso:   | 200 a 250 g |
| Linhagem/Raça: | Wistar                                |        |         |         |             |

**Local do experimento:** Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/UFMA.

São Luís, 12 de setembro de 2019.

  
**Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho**  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

1

## ANEXO B – ARTIGO 1 – ACEITE DE PUBLICAÇÃO NO VETERINARY WORLD – OPEN ACCESS AND PEER REVIEWED JOURNAL



# VETERINARY WORLD

Open access and peer reviewed journal

Star, Gulshan Park, NH-8A, Chandrapur Road, Wankaner - 363621, Dist. Morbi (Gujarat) India,

Website: [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org), Email: [edit@veterinaryworld@gmail.com](mailto:edit@veterinaryworld@gmail.com)

Editor-in-Chief: Anjum V. Sherasiya, Publisher: Veterinary World, EISSN: 2231-0916

SCOPUS: Citescore - 3.2, SJR - 0.433, SNIP - 0.858; Clarivate: Impact factor - 1.6

### By E-mail

Date: 16-10-2023

Ref. No. VW/Accept/247/2023

To,  
Rafael Abreu Lima  
Graduate Program in Health Sciences,  
Center for Biological and Health Sciences,  
Federal University of Maranhão,  
São Luís, 65085-580,  
Brazil  
E-mail: [rafael.al@ufma.br](mailto:rafael.al@ufma.br)

### Acceptance of article for publication in Veterinary World

Dear Dr.

I am pleased to inform you that your manuscript titled as -

**Recent advances in the treatment of pain in endometriosis: A bibliometric analysis in experimental models** - Rafael Abreu Lima, Isabela Bastos Jácome Souza, Gustavo Medeiros Frota, Tereza Cristina Monteiro Melo Prazeres, Ingrid Campos Albuquerque, Eduardo Martins Sousa, Maria do Socorro Sousa Cartagenes, Rafael Cardoso Carvalho, Adalgisa Sousa Paiva Ferreira, and João Batista Santos Garcia

is accepted for publication in *Veterinary World*.

We have received the payment for publication (bill no. 176 dated 16-10-2023). So, you will receive the galley proof within 4-5 weeks. You must have to solve the query, if we point out any in galley proof.

After correction of galley proof, your article will be published online at [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org) in chronological order.

Thanking You.

Yours Sincerely,

Dr. Anjum V. Sherasiya  
Editor-in-Chief  
Veterinary World



Indexed and Abstracted in Academic Journals Database, AGORA, AGRICOLA, AGRIS, CABI, CAS, DOAJ, EBSCO, ESCI-Thomson Reuters, Gale, Google Scholar, HINARI, Index Scholar, Indian Animal Science Abstracts, Indian Science Abstracts, JournalSeek, Open J-gate, ProQuest, PubMed, PubMed Central, SCOPUS, TEEAL

**ANEXO C – ARTIGO 2 – ACEITE NA REVISTA CONTEXTO & SAÚDE**

ISSN: 2176-7114 (online) - ISSN 1676-188X

Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Atenção Integral à Saúde

Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos, para os devidos fins, que o artigo intitulado “**TALIDOMIDA NO MANEJO DA DOR EM ENDOMETRIOSE: UMA REVISÃO DE ESCOPO DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS**”, de autoria de Isabela Bastos Jácome de Souza, Rafael Abreu Lima, Gustavo Medeiros Frota, Felipe Silva Ribeiro, Beatriz Moraes Costa, Suzana Bastos Jácome de Souza, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes e João Batista Santos Garcia foi *Aceito para publicação* na **Revista Contexto & Saúde**. O artigo está agendado para ser publicado no **Volume 24, Número 48 (2024)**.

Ijuí (RS), 09 de novembro de 2023.

Prof.ª. Dr.ª. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz  
Editora Chefe da Revista Contexto & Saúde

## ANEXO D – TERMO DE OUTORGA – ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO

|                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                 |                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                                           | ESTADO DO MARANHÃO<br>FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO<br><b>TERMO DE OUTORGA - ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO</b> | <b>Processo</b><br><b>UNIVERSAL-01541/18</b> |
| <b>IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE</b>                                                                                                                         |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>NOME:</b><br>FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)                                    |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>LEGISLAÇÃO:</b><br>LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.                                                                                    |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>ENDEREÇO:</b><br>Rua Perdizes, nº 05, Qd 37,                                                                                                            | <b>BAIRRO / CEP:</b><br>Jardim Renascença / 65075-340                                                                                                           |                                              |
| <b>RESPONSÁVEL:</b><br>Alex Oliveira de Souza                                                                                                              | <b>CARGO:</b><br>DIRETOR-PRESIDENTE                                                                                                                             |                                              |
| <b>IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO</b>                                                                                                                          |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>NOME:</b> JOAO BATISTA SANTOS GARCIA                                                                                                                    |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>CPF:</b><br>135.570.488-02                                                                                                                              | <b>IDENTIDADE:</b><br>238419940                                                                                                                                 |                                              |
| <b>BANCO</b><br>Brasil                                                                                                                                     | <b>Nº AGÊNCIA:</b><br>1878-3                                                                                                                                    | <b>Nº CONTA:</b><br>6876-4                   |
| <b>INSTITUIÇÃO:</b><br>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO                                                                                                    |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>DEPARTAMENTO:</b><br>Departamento de Medicina II                                                                                                        |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>ENDEREÇO:</b><br>AV. SÃO MARCOS, LOTE 4, QUADRA C, APT.502                                                                                              | <b>BAIRRO:</b><br>Ponta da Areia                                                                                                                                | <b>CIDADE:</b><br>SÃO LUÍS                   |
| <b>CEP:</b><br>65.077-310                                                                                                                                  | <b>U.F.:</b><br>MARANHÃO                                                                                                                                        | <b>FONE FIXO</b><br>98-32274508              |
| <b>ENDEREÇO ELETRÔNICO:</b><br>jbgarcia@uol.com.br                                                                                                         |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO</b>                                                                                                                            |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>UNIVERSAL-01541/18</b>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                 | <b>VIGÊNCIA:</b> 08/11/2018 a 08/11/2020     |
| <b>MODALIDADE:</b><br>UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL                                                                                  |                                                                                                                                                                 | <b>EDITAL FAPEMA Nº 002/2018 - UNIVERSAL</b> |
| <b>TÍTULO DO PROJETO:</b><br>AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO, MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO DA TALIDOMIDA EM RATAS COM ENDOMETRIOSE INDUZIDA |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>ÁREA / SUBÁREA :</b><br>Ciências da Saúde / MEDICINA                                                                                                    |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO</b>                                                                                                                         |                                                                                                                                                                 |                                              |
| <b>DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS</b>                                                                                               | <b>NÚMERO DE PARCELA(S)</b>                                                                                                                                     | <b>VALOR TOTAL</b>                           |
| 08/12/2020                                                                                                                                                 | 02                                                                                                                                                              | R\$ 38.939,77                                |

**TERMO: 002928/2018**

**CLÁUSULAS**

- Cláusula 01** - O auxílio será concedido conforme condições estabelecidas pela FAPEMA.
- Cláusula 02** - Para efeito deste Termo, a FAPEMA será doravante denominada OUTORGANTE e o beneficiado, OUTORGADO.
- Cláusula 03** - O auxílio, em hipótese alguma, poderá ser destinado para fins diversos dos especificados neste Termo.
- Cláusula 04** - O OUTORGADO declara conhecer integralmente as regras, condições e exigências estabelecidas no Edital nº 002/2018, comprometendo-se ainda a cumprir as exigências descritas no documento citado.
- Cláusula 05** - O OUTORGADO é o único responsável pela elaboração da prestação de contas do auxílio percebido.
- Cláusula 06** - O OUTORGADO obriga-se a apresentar a OUTORGANTE à prestação de contas no prazo de 30 (trinta) dias após o término da concessão do benefício, conforme as normas contidas no Manual de Prestação de Contas da FAPEMA, disponível no portal ([www.fapema.br](http://www.fapema.br)).
- Cláusula 07** - A não apresentação das prestações de contas e demais documentos pertinentes nos prazos estabelecidos ensejará a devolução dos recursos já percebidos, ficando o OUTORGADO impedido de receber novos benefícios de qualquer natureza junto a OUTORGANTE.
- Cláusula 08** - É proibido ao OUTORGADO efetuar quaisquer despesas fora da vigência avençada no presente Termo.
- Cláusula 09** - O OUTORGADO obriga-se a comunicar, por escrito, à OUTORGANTE, qualquer interrupção das atividades concernentes ao projeto, tais como, mudança de endereço, licença para tratamento de saúde, maternidade, paternidade, etc, no prazo de 5 (cinco) dias antecedentes ao afastamento.
- Cláusula 10** - O OUTORGADO cede, desde logo, seus direitos autorais para acesso livre, por meio de repositórios institucionais ou eletronicamente em caso de livros digitais, respeitado o preconizado na Lei nº. 9.610/98 (Lei dos Direitos Autorais).
- Cláusula 11** - O OUTORGADO declara zelar pela adequada proteção dos direitos de propriedade intelectual que possam resultar do projeto apoiado pela OUTORGANTE.
- Cláusula 12** - O OUTORGADO obriga-se a fazer referência ao apoio da OUTORGANTE em todas as formas de divulgação que resultem, total ou parcialmente, de auxílio objeto desse Termo de Outorga, utilizando a logomarca da FAPEMA, de forma adequada e se responsabilizando, ainda, a disponibilizar o mínimo de 20% da tiragem apoiada pela OUTORGANTE para instituições de ensino, pesquisa e/ou bibliotecas públicas.
- Cláusula 13** - O OUTORGADO aceitará qualquer fiscalização que a FAPEMA julgar conveniente proceder.
- Cláusula 14** - O OUTORGADO na aquisição de materiais permanentes móveis, tais como notebooks; tablets, mas não se limitando a esses, deverá contratar seguro específico do bem sob sua guarda e responsabilidade, até que seja efetuada a doação ou cessão de uso à Instituição. Não fazendo o seguro o Outorgado arcará com a restituição financeira à FAPEMA no caso de sinistro (roubo, furto e perda).
- Cláusula 15** - A OUTORGANTE poderá, a qualquer tempo e a seu exclusivo critério, cancelar ou suspender o auxílio sem que disso resulte direito algum à reclamação ou à indenização para o OUTORGADO.
- Cláusula 16** - Integra o presente Termo, independentemente de sua transcrição no presente documento, o Edital a que se submete o OUTORGADO e o Manual de Prestação de Contas da FAPEMA.
- Cláusula 17** - O presente Termo não cria e não envolve nenhuma espécie de relação empregatícia entre o OUTORGADO e a OUTORGANTE.
- Cláusula 18** - O OUTORGADO declara que aceita, sem restrições, o auxílio como está deferido e se responsabiliza pelo fiel cumprimento do presente Termo e do Edital citado, em todas as suas especificações, cláusulas e condições, sob pena, de assim não fazê-lo, devolver os recursos oriundos deste benefício à OUTORGANTE.
- Cláusula 19** - Fica eleito o foro de São Luís/MA para dirimir questões oriundas do presente ajuste, com renúncia expressa de qualquer outro, por mais privilegiado que seja.
- Cláusula 20** - O presente Termo retroage seus efeitos a data de início da vigência.

LOCAL, DATA E ASSINATURA

São Luís (MA), Data: 08 de Novembro de 2018

\_\_\_\_\_  
OUTORGADO\_\_\_\_\_  
Alex Oliveira de Souza  
DIRETOR PRESIDENTE FAPEMA  
OUTORGANTE**TERMO: 002928/2018**