

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina**

**ROBERTA ÁVILA DO NASCIMENTO TAVARES**

**Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de  
droga antiproliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão  
lipídica (LDE)**

Versão original



**São Paulo  
2023**

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina**

**ROBERTA ÁVILA DO NASCIMENTO TAVARES**

**Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de  
droga antiproliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão  
lipídica (LDE)**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

**São Paulo  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Roberta Avila do Nascimento  
Tratamento clínico de endometriose profunda com  
uso de droga antiproliferativa (metotrexato)  
acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE) / Roberta  
Avila do Nascimento Tavares. -- São Paulo, 2023.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.  
Orientador: Sérgio Podgaec.

Descritores: 1.Endometriose 2.Dor pélvica  
3.Nanoemulsão 4.Metotrexato 5.Tratamento clínico  
6.Nanopartículas 7.Terapia alvo

USP/FM/DBD-022/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho **Guilherme**, que se tornou o porquê de tudo na minha vida desde a sua chegada. Redimensionou as dificuldades, preencheu meu mundo com a constância do seu amor puro, me fazendo sentir gratidão eterna pela generosidade da vida. Filhos são a prova genuína do amor de Deus. “Que dentre os muitos papéis que exerço, eu saiba sempre que ser mãe é o maior deles! Mas que tenha sabedoria para enxergar que, apesar de muito importante, não é o único”.

À minha irmã **Marcela**, que sempre me apoiou, mesmo nas muitas ausências familiares, que sempre foi ombro amigo nas dificuldades, e que não foi diferente nesta jornada de pós-graduação. Meu mais sincero agradecimento pelo apoio fundamental neste período, por me ouvir, me incentivar, e por ser sempre a melhor pessoa para recorrer.

Aos meus **pais**, pelas orações de sempre, e por nunca compreenderem por completo as minhas ausências, por sempre desejarem estar mais próximos do que conseguíamos. A saudade sincera e essa “incompreensão” me ajudaram a distribuir um pouco melhor o tempo.

Ao **Rafael**, meu muito obrigada pelo maior presente que recebi em toda a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Sérgio Podgaec**, por sua dedicação, acessibilidade, brilhantismo, seriedade, pelas cobranças e por entender mais do que eu mesma a importância das coisas ao seu tempo, em fases tão particulares da minha vida.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, Professor Titular da Disciplina de Ginecologia, pelo incentivo e oportunidade.

Ao Prof. Dr. **Raul Cavalcante Maranhão** pela paciência, pela disponibilidade de sempre, pelas contribuições preciosíssimas em todas as fases do projeto, pelo incentivo em continuar. Por ser cientista na mais pura definição.

Ao Prof. Dr. **Luciano Gibran**, professor incansável e amigo, por acreditar que eu pudesse conduzir esse projeto, por sempre me incentivar a progredir, por me abrir as primeiras portas profissionais, por ter me ensinado tanto sobre cirurgia e sobre endometriose. Obrigada pela transparência e sinceridade tão características suas!

Ao Prof. Dr. **Maurício Abrão**, por ser exemplo, por ser brilhante, por todas as sugestões recebidas. Minha sincera admiração.

À **Thauany Martins Tavoni**, pela grande disponibilidade em ajudar, pela presença tranquila e pelas contribuições extremamente relevantes no projeto e no artigo.

Ao Dr. **Manoel Orlando Gonçalves**, por disponibilizar seu tempo escasso para a realização de todos os exames da pesquisa, meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. **Luiz Gustavo Oliveira Brito**, pelas contribuições sempre assertivas e pela grande disponibilidade em ajudar em muitas fases deste projeto.

À Prof. Dra. **Cristina Laguna Benetti Pinto**, por sempre incentivar a realização da pós-graduação, e por ser inspiração de conduta ética.

Ao Sr **Helymar Machado**, pela execução e pelos ensinamentos de análise estatística.

À Srta **Kelly Mancini**, enfermeira do setor de quimioterapia do Hospital Pérola Byington, por ter aberto as portas do seu local de trabalho para a realização do projeto, por ter acolhido tão bem as pacientes da pesquisa, por facilitar em todos os sentidos a realização da mesma, apesar das dificuldades inerentes aos serviços públicos.

Às **pacientes** com endometriose, sem as quais esta dissertação não seria possível, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus **alunos** de ontem, de hoje e de amanhã, por serem a razão de eu buscar sempre melhorar pessoal e profissionalmente.

# SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURA

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

## **1 INTRODUÇÃO**

1.1 Endometriose.....	1
1.1.1 Endometriose e dor.....	5
1.2 Metotrexato.....	6
1.2.1 Aplicação clínica.....	8
1.2.2 Perfil de toxicidade.....	9
1.2.3 Contraindicações.....	10
1.2.4 Impacto reprodutivo.....	10
1.2.5 Metotrexato e Endometriose.....	12
1.3 Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e Nanoemulsão Lipídica (LDE).....	13
1.4 Composto LDE-MTX.....	15
1.5 Hipótese do Estudo.....	16

## **2 OBJETIVOS**

2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

3.1 Tipo do estudo.....	19
3.2 Local do Estudo.....	19
3.3 Princípios Éticos.....	19
3.4 Critérios de Inclusão.....	20
3.5 Critérios de Exclusão.....	21
3.6 Pacientes.....	21
3.7 Dinâmica do Estudo.....	21
3.8 Ultrassom Transvaginal com Preparo Intestinal.....	27
3.9 Síntese do derivado de MTX e preparação do LDE-MTX.....	27
3.10 Análise estatística.....	28

## **4 RESULTADOS**

4.1 Avaliação pré-medicação	
4.1.1 Características físicas das pacientes.....	30
4.1.2 Quadro Clínico.....	30
4.1.3 Exame Físico.....	32
4.1.4 Exame de Imagem.....	33
4.2 Administração do LDE-MTX.....	34
4.3 Efeitos pós-medicação	
4.3.1 Sintomas clínicos.....	35

4.3.2 Exame Físico.....	36
4.3.3 Avaliação laboratorial.....	37
4.3.4 Avaliação Ultrassonográfica.....	38
4.3.5 Análise comparativa longitudinal entre doses e tempos.....	39
<b>5 DISCUSSÃO</b>	
5.1 Toxicidade.....	45
5.2 Avaliação Laboratorial.....	46
5.3 Avaliação Clínica.....	48
5.4 Avaliação Ultrassonográfica.....	50
5.5 Comparações entre doses.....	51
5.6 Nanotecnologia e Endometriose.....	53
5.7 Limitações.....	56
5.8 Considerações Finais.....	56
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboximide ribonucleotide
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
ALT	Alanina Aminotransferase
AMH	<i>Anti-Müllerian Hormone</i> (Hormônio Anti-mülleriano)
ApoB100	Apolipoproteína B100
ApoE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato Aminotransferase
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COC	Contraceptivo Oral Combinado
Covid	<i>Coronavirus disease</i> (Doença provocada pelo Coronavírus)
DIE	<i>Deep Infiltrating Endometriosis</i> (Endometriose profunda infiltrativa)
DHFR	Diidrofolato-redutase
E+P	Estrogênio + Progesterona
ER- $\beta$	<i>Estrogen Receptor Beta</i> (Receptor de Estrogênio Beta)
EVA	Escala Visual Analógica de dor
FALC	Fosfatase Alcalina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR	<i>Folate Receptor</i> (Receptor de Folato)
FSH	<i>Follicle-stimulating Hormone</i> (Hormônio Folículo Estimulante)
GE	<i>General Electric</i>
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Hormônio liberador de gonadotrofinas)
Hb	Hemoglobina
HL60	Células humanas leucêmicas promielocíticas
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (Concentração Inibitória 50)
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
InCor	Instituto do Coração
K562	Células humanas eritroleucêmicas
LDE	Nanoemulsão Lipídica
LDE-MTX	Derivado lipofílico do Metotrexato associado à Nanoemulsão Lipídica
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LDL-R	Receptor de LDL
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormônio Luteinizante)
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL

MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (Proteína Quimiotática de Monócitos-1)
MIF	Fator Inibitório da Migração de Macrófagos
MTX	Metotrexato
MTXPG	<i>Methotrexate Polyglutamates</i> (Poliglutamatos de Metotrexato)
NGF	<i>Neural Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Neural)
PGE2	Prostaglandina E2
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RFC	<i>Reduced Folate Carrier</i> (Carreador de folato reduzido)
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SUA	Sangramento Uterino Anormal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th2	Linfócitos T-helper 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumoral Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TS	Timidilato Sintase
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i> (Hormônio Tireoestimulante)
TVUS-BP	<i>Transvaginal Ultrasound with Bowel Preparation</i> (Ultrassom Transvaginal com Preparo Intestinal)
US	Ultrassom
USTV	Ultrassom Transvaginal
VAS	<i>Visual Analogue Scale</i> (Escala Visual Analógica)
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> (Molécula de Adesão de Célula Vascular)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
5-CH <sub>3</sub> -THF	Leucovorin

## LISTA DE FIGURA

Figura 1	Fluxograma de seleção de pacientes para participação na pesquisa.....	22
----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais das pacientes incluídas na pesquisa.....	30
Tabela 2	Tipos de medicação hormonal utilizadas para tratamento da endometriose pelas pacientes incluídas na pesquisa.....	31
Tabela 3	Tipos de medicação não-hormonal* utilizadas para alívio dos sintomas álgicos pelas pacientes incluídas na pesquisa.....	31
Tabela 4	Quadro clínico referido pelas pacientes incluídas na pesquisa antes da medicação, discriminando a nota da escala visual analógica (EVA) de dor em cada item.....	32
Tabela 5	Achados no exame físico pré-medicação, relacionados à presença de endometriose, nas pacientes incluídas na pesquisa.....	33
Tabela 6	Medidas das lesões de endometriose visualizadas ao ultrassom antes da medicação.....	34
Tabela 7	Frequência de efeitos colaterais imediatos e tardios após administração do LDE-MTX.....	35
Tabela 8	Sintomas clínicos avaliados de acordo com a escala visual analógica de dor (EVA) antes e após 90, 120 e 180 dias da medicação, expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	36
Tabela 9	Exame físico das pacientes antes (A) e depois (D) de 180 dias da medicação.....	37
Tabela 10	Comparativo de exames laboratoriais antes da medicação, após 90 e após 180 dias.....	38
Tabela 11	Média das medidas das lesões de endometriose ao ultrassom transvaginal antes da medicação, após 30 dias e após 180 dias.....	39
Tabela 12	Comparação de sintomas clínicos avaliados pela escala visual analógica de dor (EVA) entre uma dose e duas doses de medicação, ao longo do tempo.....	40

Tabela 13	Comparação das lesões de endometriose ao ultrassom, entre uma dose e duas doses de medicação, ao longo do tempo.....	41
Tabela 14	Comparação entre os resultados de exames laboratoriais ao longo do tempo, entre uma dose e duas doses da medicação.....	42

## RESUMO

Tavares RAN. *Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de droga antiproliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Dor pélvica e infertilidade são os sintomas mais comuns em pacientes com endometriose, com forte impacto na qualidade de vida. A doença está associada a inflamação e níveis elevados de citocinas no plasma, o que sustenta a hipótese de que a dor na endometriose está relacionada ao processo inflamatório subjacente. Tanto o tratamento hormonal quanto o cirúrgico da endometriose apresentam limitações, o que incentiva a busca por novas abordagens terapêuticas. Em estudo anterior, foi demonstrado que, assim como os tumores malignos, as lesões de endometriose profunda exibiam superexpressão de receptores de LDL. Posteriormente, também foi demonstrado que o LDE foi intensamente captado por essas lesões. Essas descobertas sinalizam para a possibilidade do uso do LDE como carreador de drogas no tratamento da endometriose, especialmente em mulheres com lesões difíceis de excisar cirurgicamente. **Objetivo:** avaliar a segurança e eficácia do uso do metotrexato acoplado à nanoemulsão lipídica (LDE-MTX) para o tratamento clínico da endometriose profunda intestinal. **Pacientes e métodos:** Estudo piloto, com uma coorte de 11 pacientes com endometriose profunda e intestinal, que receberam uma dose (n=3) intravenosa de LDE-MTX (25 mg/m<sup>2</sup>), ou duas doses (n=8) de LDE-MTX (total 50 mg/m<sup>2</sup>), com intervalo de uma semana. Todas as pacientes tinham queixa de dor pélvica com nota maior ou igual a 7 na escala visual analógica de dor (EVA) e todas apresentavam ultrassom pélvico e transvaginal com preparo intestinal indicando a presença de lesão intestinal acometendo, no mínimo, a camada muscular interna da parede do retossigmóide. As pacientes foram avaliadas quanto às queixas clínicas antes e após 90, 120 e 180 dias da medicação e examinadas antes e após 180 dias da medicação. As lesões de endometriose foram mensuradas por meio do ultrassom antes e após 30 e 180 dias da medicação; exames laboratoriais para controle de toxicidade foram realizados antes e após 90 e 180 dias. **Resultados:** As pacientes apresentavam idade entre 30 e 47 anos, eram primíparas na maioria (54,55%) e, em média, tinham sobrepeso (IMC médio de 26,15 kg/m<sup>2</sup> ± 6,50). Oito pacientes faziam uso de medicação hormonal e nove faziam uso de medicação analgésica. A maioria das pacientes não apresentou eventos adversos durante a infusão do LDE-MTX, mas sintomas tardios como náuseas (n=7) e dor abdominal (n=6) foram reportados. Os escores de dispareunia

( $p < 0,001$ ), dor pélvica acíclica ( $p = 0,008$ ) e disquezia ( $p = 0,025$ ) melhoraram significativamente ao longo do período avaliado. A queixa de dismenorreia mostrou redução na EVA, mas não estatisticamente significativa. Não houve mudanças no exame físico das pacientes. As lesões intestinais visualizadas ao ultrassom não apresentaram mudança significativa em relação ao tamanho e diâmetro. As dosagens séricas de FSH, LH, hormônio anti-mülleriano e prolactina não apresentaram alteração estatisticamente significativa. Os valores de TSH, AST, ALT, hemoglobina, leucócitos e plaquetas apresentaram aumento estatisticamente significativo; no entanto, excetuando o TSH, todos os outros parâmetros se mantiveram dentro da faixa de normalidade. Subgrupo de análise entre infusão de uma ou duas doses de LDE-MTX não demonstrou diferença ( $p > 0,005$ ), mas encontrou diferença ao longo do tempo para dispareunia ( $p = 0,002$ ), dor acíclica ( $p = 0,008$ ) e disquezia ( $p = 0,025$ ), sendo observada diferença significativa entre os tempos, com comportamento diferente dentro de cada dose. Para a queixa de disquezia, o valor global de  $p$ , que é significativo, se atribui à realização de duas doses da medicação. **Conclusão:** De acordo com os resultados observados no presente estudo, podemos concluir que houve melhora significativa nas queixas de dispareunia, dor pélvica acíclica e disquezia nas pacientes com endometriose profunda e intestinal tratadas com LDE-MTX, sem relato de eventos adversos graves. Em relação ao tamanho das lesões avaliadas por meio do ultrassom, não foram observadas mudanças. Entendemos que pesquisas futuras com diferentes doses desta medicação devem ser realizadas para melhor análise dos potenciais benefícios desse modelo inovador de tratamento da endometriose.

**Palavras-chave:** Endometriose; Dor pélvica; Nanoemulsão; Metotrexato; Tratamento clínico; Nanopartículas; Terapia alvo.

## ABSTRACT

Tavares RAN. *Clinical treatment of deep infiltrative endometriosis with antiproliferative drug (methotrexate) carried in lipid core nanoparticles (LDE)* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** Pelvic pain and infertility are the most common symptoms in patients with endometriosis, with strong impact on the quality of life. The disease is associated with inflammation and higher levels of cytokines in the plasma, which supports the hypothesis that pain in endometriosis is mostly associated with the underlying inflammatory process. Both hormonal and surgical treatment of endometriosis have limitations. In view of the difficulties in the management of the disease, the search for novel therapeutic approaches is appealing. In a previous study, it was demonstrated that, similarly to malignant tumors, deep bowel endometriotic lesions also exhibit overexpression of LDL receptors. Subsequently, it was also showed that LDE was intensively taken-up by endometriotic lesions. Those findings paved the avenue for the use of LDE as drug carrier in the treatment of endometriosis, especially in women with lesions difficult to excise surgically. **Objective:** To assess the safety and efficacy of intravenous methotrexate carried in lipid core nanoparticles (LDE-MTX) in women with deep infiltrating endometriosis (DIE) in the rectosigmoid area. **Patients and methods:** This is a pilot, cohort study with 11 women with bowel endometriosis, who received one dose (n=3) of intravenous LDE-MTX (25 mg/m<sup>2</sup>), or two doses (n=8) (total 50 mg/m<sup>2</sup>). When two doses were applied, it was given one week interval between them. All patients had Visual Analogue Scale (VAS) pain score equal or higher than 7 (n=11), and all had transvaginal ultrasound exam with bowel preparation (TVUS-BP) with bowel lesion affecting, at least, the internal muscle layer. Patients were evaluated for clinical complaints before and after 90, 120 e 180 days of medication and examined before and after 180 days of medication. Endometriotic lesions were measured by TVUS-BP before and after 30 and 180 days of medication; laboratory tests for toxicity control were performed before and after 90 and 180 days. **Results:** Women presented 30-47 years old, were mostly primiparous (54.55%) and, in average, overweight (mean BMI=26.15 kg/m<sup>2</sup> ± 6.50). Eight patients used hormonal medication and nine used analgesic medication. Most patients did not experience any adverse events during the infusion of LDE-MTX and late symptoms such as nausea (n=7) and abdominal pain (n=6) have been reported. The scores of dyspareunia (p<0,001), acyclic pain (p=0,008) and dyschezia (p=0,025) improved significantly over the period evaluated. The complaint of dysmenorrhea



showed a reduction in the VAS, but not statistically significant. There were no changes in the physical examination of patients. Bowel lesions detected by TVUS did not change significantly in relation to size/ diameter. The serum measurements of FSH, LH, anti-mullerian hormone and prolactin did not show any significant change. The values of TSH, AST, ALT, hemoglobin, leukocytes and platelets showed a statistically significant increase; however, with the exception of TSH, all other parameters remained within the normal range. Subgroup analysis between doses showed no difference between doses ( $p > 0,005$ ) but found a difference over time for dyspareunia ( $p = 0.002$ ), acyclic pain ( $p = 0.008$ ) and dyschezia ( $p = 0,025$ ) (there was a difference between times, with different behavior within each dose). For the complaint of dyschezia, the global value of  $p$ , which is significant, is attributed to the infusion of two doses of the drug. **Conclusion:** According to the results of this study, we can conclude that there was a significant improvement in complaints of dyspareunia, acyclic pain and dyschezia in patients with deep bowel endometriosis treated with LDE-MTX and serious adverse events were not reported. Regarding the size of the lesions assessed by ultrasound, no changes were observed. We understand that future research with different doses of this medication should be carried out to better analyze the potential benefits of this innovative model of treatment of endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis; Pelvic pain; Nanoemulsion; Methotrexate; Clinical treatment; Nanoparticles; Target therapy.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Endometriose

Endometriose é definida pela presença de glândulas e/ou estroma endometriais fora do útero (Benagiano *et al.*, 2014) e endometriose profunda consiste nas lesões com infiltração peritoneal superior a 5 mm (Cornillie *et al.*, 1990).

Sua prevalência corresponde a 6 a 18% da população feminina (Eskenazi *et al.*, 1997; Giudice & Kao, 2004; Parasar *et al.*, 2017; Shafrir *et al.*, 2018, Moradi *et al.*, 2021), mas este percentual é maior no subgrupo de mulheres com queixa de infertilidade e dor pélvica (Wattiez *et al.*, 2013; Parasar *et al.*, 2017, Moradi *et al.*, 2021). Estas duas principais manifestações clínicas são responsáveis pelo grande prejuízo social das mulheres afetadas por esta doença e, quando somados ao comum atraso no diagnóstico e tratamento adequados, levam à diminuição drástica na qualidade de vida (Wattiez *et al.*, 2013). O tratamento cirúrgico da endometriose parece aumentar a chance de gravidez (Donnez & Squifflet, 2010; Roman *et al.*, 2018), além de aumentar as taxas de sucesso quando realizada antes da fertilização in vitro (Casals *et al.*, 2021), ressaltando o impacto negativo desta afecção sobre a fertilidade feminina (Darai *et al.*, 2017). Outras queixas incluem dismenorréia, dispareunia de profundidade, disquezia e alterações urinárias cíclicas, comuns na doença profunda (Koninckx *et al.*, 2012).

A laparoscopia é considerada padrão-ouro para o diagnóstico e tratamento da endometriose (Catenacci *et al.*, 2009; Nezhat *et al.*, 2022) e diversos estudos mostraram que a exérese cirúrgica da doença reduz a queixa algica associada à endometriose, embora os dados sejam conflitantes (Jacobson *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2014; de Paula Andres *et al.*, 2017; Bafort *et al.*, 2020; Zondervan *et al.*, 2020). No entanto, como a cirurgia não é tratamento indicado em todos os casos, o exame físico direcionado associado a métodos de imagem específicos têm sido bastante utilizados na tentativa de aperfeiçoar o diagnóstico não-invasivo da doença (Abrão *et al.*, 2015). Os achados apresentados pela

evolução dos métodos de imagem (Abrão *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2021) representaram um grande avanço para o melhor tratamento da doença profunda e praticamente eliminaram a necessidade da laparoscopia diagnóstica (Tirlapur *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2021; Koninckx *et al.*, 2021). Os métodos de imagem têm papel fundamental no planejamento terapêutico da paciente com endometriose, principalmente quando há indicação cirúrgica, auxiliando na programação de equipe multidisciplinar para maior segurança no procedimento ou ainda, para conscientizar a paciente dos potenciais riscos cirúrgicos (Donnez *et al.*, 2010; Wolthuis *et al.*, 2014; Abrão *et al.*, 2015).

Estudos prévios demonstraram que tanto a ressonância magnética (RNM) quanto o ultrassom transvaginal (USTV), desde que realizado com protocolo adequado e por profissional experiente na avaliação das imagens, têm altas taxas de acurácia no diagnóstico de endometriose profunda, com índices discretamente melhores para a ultrassonografia, que alcançou sensibilidade de 95-98%, especificidade de 98-100%, valor preditivo positivo de 98-100%, valor preditivo negativo de 97-98%, e acurácia de 97 a 99%, dependendo da localização das lesões (Abrão *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009). O USTV com preparo intestinal foi estabelecido como um exame adequado para avaliação detalhada das lesões intestinais, ajudando no planejamento cirúrgico da abordagem mais adequada (shaving, ressecção discóide ou segmentar) (Gonçalves *et al.*, 2010). Por meio destes exames é possível determinar, além da localização das lesões, as medidas precisas de extensão e profundidade, o que também permite o acompanhamento clínico de pacientes com boa resposta às terapias hormonais disponíveis (Abrão *et al.*, 2015; Andres *et al.*, 2019).

Outro dado importante relacionado à abordagem da doença, refere-se ao fato do tratamento cirúrgico da endometriose profunda, mesmo quando a equipe é experiente, apresentar risco de complicações (De Cicco *et al.*, 2011; Ceccaroni *et al.*, 2012; Imboden *et al.*, 2021; Tschann *et al.*, 2021). Uma revisão sobre ressecção intestinal para o tratamento de endometriose profunda mostrou taxa de complicação de 22,2%, sendo que complicações maiores ocorreram em 11% das mulheres, com 6,4% de complicações intestinais severas (De Cicco *et al.*,

2011). Disfunções intestinais e vesicais temporárias, consideradas como complicações menores, ocorreram em 14,7% das pacientes (De Cicco *et al.*, 2011). Outro estudo publicado em 2013 mostrou taxa de 17,9% de comprometimento ureteral por endometriose quando a lesão retrocervical apresentava diâmetro superior ou igual a 30 mm (Kondo *et al.*, 2013), aumentando o risco intra-operatório de lesão ureteral. Um estudo de coorte retrospectivo procurou avaliar os fatores preditivos para disfunções miccionais após cirurgia de endometriose profunda, e correlacionou a presença de lesões de endometriose profunda que se encontravam entre o ligamento uterossacro e a parede pélvica com o aumento significativo do risco de disfunções miccionais pós-operatórias, seja por dano ao plexo hipogástrico inferior, mais especificamente aos nervos esplâncnicos pélvicos, como por dano direto aos nervos autonômicos causado pelos nódulos de endometriose (Imboden *et al.*, 2021).

Algumas disfunções intestinais podem ser observadas após cirurgias com ressecção intestinal, como constipação crônica por denervação do cólon (Roman *et al.*, 2013). Outros resultados adversos incluem a necessidade de derivação intestinal com estomias, estenose da área de anastomose, diarreia crônica com incontinência fecal (observada nas lesões mais baixas), fístulas, retenção urinária e disfunção vesical (também associadas à denervação de plexo hipogástrico inferior) e lesões vasculares inadvertidas, situações indesejadas que podem conduzir à reabordagens cirúrgicas posteriores (Minelli *et al.*, 2009). Outro estudo, acerca das complicações com a ressecção segmentar para o tratamento de endometriose intestinal, relatou alterações funcionais persistentes na esfera sexual em 64% das pacientes, principalmente dificuldades na lubrificação e anorgasmia, além das mencionadas disfunções intestinais e urinárias, no geral transitórias (Turco *et al.*, 2020).

Apesar do tratamento cirúrgico ser considerado como alternativa importante quando indicado de forma adequada, uma revisão sistemática encontrou, entre mulheres com endometriose profunda operadas, taxas de recorrência variando de 2 a 43,5% (Ianieri *et al.*, 2018). A supressão hormonal no pós-operatório parece reduzir esse risco, segundo revisão sistemática que

incluiu 2137 pacientes, além de reduzir a queixa de dor (Zakhari *et al.*, 2021). A influência do tipo de ressecção intestinal realizado (shaving, ressecção discoide ou segmentar) e o risco de recorrência ainda é um dado conflitante (Ianieri *et al.*, 2018).

Por outro lado, as opções terapêuticas não-cirúrgicas disponíveis giram em torno do tratamento hormonal à base de progestagênios, que têm ação atrófica e anti-inflamatória no endométrio tópico e nas lesões de endometriose (Ferrero *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2015). O uso de contraceptivos orais combinados, agonistas ou antagonistas de GnRH e progestagênios isolados demonstrou ser eficaz no controle da dor em cerca de 2/3 das pacientes (Vercellini *et al.*, 2016; Andres *et al.*, 2019; Samy *et al.*, 2021). Os agonistas de GnRH apresentam impacto negativo na densidade mineral óssea das usuárias e múltiplos efeitos colaterais da privação hormonal, sendo pouco utilizados atualmente (Berlanda *et al.*, 2016). Além disso, em estudo que comparou a ação do agonista do GnRH no tratamento de endometriose peritoneal superficial e de endometriose profunda concluiu que a medicação foi incapaz de suprimir a atividade mitótica e diminuir a vascularização estromal nos casos de endometriose profunda, ao contrário da ação na endometriose peritoneal, que apresentou diminuição drástica da vascularização estromal (Donnez *et al.*, 1996). Esses dados sinalizam para provável diferença etiológica das apresentações da doença, com implicações no tratamento das entidades clínicas, o qual deve ser diferenciado (Kamergorodsky *et al.*, 2009).

Há que se considerar também que o tratamento clínico hormonal inviabiliza a correção de uma das maiores queixas associada a esta doença, que é a infertilidade. Todas essas justificativas impulsionam para a busca de alternativas ao tratamento cirúrgico e à supressão hormonal, que contemplem a melhora do quadro algico associado à endometriose e que minimizem as limitações, presentes nas atuais opções. Neste sentido, o desenvolvimento de terapias farmacológicas sítio-específicas poderia representar um grande ganho na diminuição da morbidade associada às terapêuticas atuais.

### 1.1.1 Endometriose e dor

Estudos demonstraram que existem muitos mecanismos relacionados às queixas algícas das pacientes com endometriose e, apesar de um grande número de pesquisas nesta área, não há tratamento definitivo para o controle da dor, o sintoma mais impactante na qualidade de vida da paciente portadora da doença (Howard, 2009; Machairiotis *et al.*, 2021). Existem, pelo menos, três mecanismos principais que originam a dor nessas pacientes: a dor de origem nociceptiva, inflamatória e neuropática (Howard, 2009).

As pesquisas ao longo dos anos demonstraram a associação da doença com inflamação e com níveis aumentados de citocinas (Podgaec *et al.*, 2007; Nothnick & Alali, 2016; Riccio *et al.*, 2018; Bellelis *et al.*, 2019; Li & LibinWeng, 2022, Brichant *et al.*, 2022), com provável relação direta entre os escores de dor e a concentração desses mediadores inflamatórios (Li & LibinWeng, 2022), o que corrobora a hipótese de que a maior parte da dor associada à endometriose é de origem inflamatória (Howard, 2009; Brichant *et al.*, 2022). O aumento das citocinas se deve à produção exacerbada tanto por células do sistema imune, quanto pelo próprio tecido endometriótico (Nothnick & Alali, 2016). Entre as citocinas identificadas existem também as que exibem atividade anti-inflamatória, o que parece contribuir para driblar o sistema imune, promovendo a sobrevivência das lesões (Zhou *et al.*, 2019). Um mecanismo que pode ser implicado nessa produção aumentada de citocinas é a resposta alterada à progesterona observada em algumas mulheres, por expressão reduzida de receptores para este hormônio. Neste caso, haveria uma resistência à ação das drogas e, desta forma, a ação antiinflamatória da progesterona, responsável pela redução da dor, não seria observada (Nothnick & Alali, 2016).

Entre os mediadores inflamatórios estudados encontram-se o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), o MIF (fator inibitório da migração de macrófagos), a PGE2 (prostaglandina E2) e o receptor de estrogênio- $\beta$  (ER- $\beta$ ) (Nothnick & Alali, 2016; Li & LibinWeng, 2022). Outros incluem as interleucinas 1, 6, 8, 10 e 17 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-17), o fator de crescimento neural (NGF), a prostaglandina F2-alfa e os mastócitos (Howard, 2009; Riccio *et al.*, 2018; Malvezzi *et al.*, 2019; Li & LibinWeng, 2022).

Foi demonstrado anteriormente uma tendência à predominância da resposta Th2 (linfócitos T helper 2) em pacientes com a doença (Podgaec *et al.*, 2007); no entanto, mais estudos vêm sendo realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos na alteração da resposta imune observadas nestas pacientes (de Barros *et al.*, 2017).

Por estes aspectos, dada a relevância da inflamação como mecanismo de promoção da dor, a inibição de mediadores inflamatórios pode ser uma alternativa eficaz às medicações hormonais, consideradas como primeira linha (Dunselman *et al.*, 2014; Zondervan *et al.*, 2020; Samy *et al.*, 2021, Brichant *et al.*, 2022) para o tratamento da dor em pacientes com endometriose profunda (Howard, 2009; Machairiotis *et al.*, 2021). Frente a isto, e por suas propriedades e mecanismo de ação, o metotrexato foi a droga de escolha para este estudo clínico.

## 1.2 Metotrexato

O metotrexato (ácido 4-amino-10 metil fólico), um dos mais antigos quimioterápicos existentes, é um agente antiproliferativo e imunossupressor utilizado no tratamento de largo espectro de doenças (Huennekens *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2011). Introduzido pela primeira vez em 1940, constitui um análogo do ácido fólico que inibe competitivamente a diidrofolato-redutase (DHFR), a timidilato sintase (TS) e também a 5-aminoimidazol-4-carboximide ribonucleotide (AICAR) formiltransferase (Estlin *et al.*, 2001; Abolmaali *et al.*, 2013). A DHFR é uma enzima importante na manutenção do pool intracelular do cofator de folato reduzido e sua inibição resulta na depleção de tetraidrofolatos (Estlin *et al.*, 2001; Abolmaali *et al.*, 2013). A TS e a AICAR são importantes enzimas na síntese *de novo* de timidilato e purinas e, para ambas, o cofator de folato reduzido é essencial (Estlin *et al.*, 2001; Abolmaali *et al.*, 2013). Sua toxicidade, comparada a de outros quimioterápicos, é relativamente baixa (Huennekens *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2011); apesar disso, seu uso não é isento de efeitos colaterais (Huennekens *et al.*, 1994; Kremer *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação do metotrexato se deve ao seu efeito antiproliferativo e imunossupressor, com os seguintes efeitos atribuídos a ele: redução da proliferação celular, aumento na apoptose das células T, aumento na liberação de adenosina endógena, alteração na expressão de moléculas de adesão celular e influência na produção de citocinas, resposta humoral e formação óssea (Wessels *et al.*, 2008; Katturajan *et al.*, 2021). O aumento na liberação de adenosina A2A na superfície das células inflamatórias, com consequente redução do acúmulo de leucócitos, e a inibição direta da proliferação celular de linfócitos envolvidos no processo inflamatório, por meio da inibição da síntese de purina e pirimidina *de novo*, são mecanismos descritos como responsáveis pela ação anti-inflamatória da droga (Wessels *et al.*, 2008; Abolmaali *et al.*, 2013).

O metotrexato entra na célula via carreador de folato reduzido (RFC - reduced folato carrier), o qual possui ampla distribuição no organismo (Kremer *et al.*, 2004). Outro grupo de proteínas que faz transporte transmembranas, chamado de receptores de folato (FRs), tem expressão variável e tipicamente são responsáveis pelo transporte de ácido fólico e da leucovorina (5-CH<sub>3</sub>-THF), a forma do folato encontrada em alimentos (Kremer *et al.*, 2004).

A resistência à droga, encontrada em modelos de cultura de células ou em pacientes oncológicos, pode resultar do aumento nos níveis de DHFR (devido à amplificação do gene), DHFR mutantes, com afinidade reduzida pelo metotrexato, ou diminuição da captação ou poliglutamação da droga. Sua característica hidrofílica, com baixa difusão nas membranas celulares, também responde pela diminuição da efetividade (Huennekens *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2011).

Apesar da droga ser efetiva para o tratamento de tumores e artrite reumatóide, o uso da forma comercial pode ser restringido pela sua farmacocinética, como por exemplo, baixa biodisponibilidade em doses elevadas, pequena meia-vida e baixa concentração nos tecidos-alvo (Abolmaali *et al.*, 2013). Soma-se a isso a variabilidade interpessoal de resposta à droga, que pode ser atribuída a variações genótípicas e polimorfismos nos genes do carreador de folato reduzido (RFC-1), da 5-aminoimidazol-4-carboximide



ribonucleotídeo (AICAR) formiltransferase, e da timidilato sintase (TS) (Dervieux *et al.*, 2004). Esses efeitos, no entanto, parecem ser suprimidos com o aumento na concentração de poliglutamatos de metotrexato (MTXPGs), resultado da ativação da droga pela folilpoliglutamato sintetase após sua entrada na célula (Dervieux *et al.*, 2004). Desta forma, indivíduos com genótipo desfavorável à ação da droga e que apresentem baixos níveis de MTXPGs podem necessitar de um tratamento com doses mais elevadas de metotrexato, no intuito de maximizar a poliglutamação da droga e atingir a eficácia esperada (Dervieux *et al.*, 2004), o que também implicaria no aumento da severidade dos efeitos colaterais da mesma (Albomaali *et al.*, 2013).

Para vencer essa resistência, muitas estratégias foram desenvolvidas. Uma delas consiste em mudar quimicamente a droga para melhorar sua lipofilicidade; outra, em desenvolver novos sistemas de *delivery* da droga, melhorando a segurança, a biodisponibilidade e a estabilidade da droga em relação à degradação química e enzimática e diminuindo a toxicidade (Moura *et al.*, 2011; Albomaali *et al.*, 2013).

### 1.2.1 Aplicação clínica

O metotrexato tem sido utilizado clinicamente para o tratamento de tumores sólidos e hematológicos, doenças autoimunes, neoplasias trofoblásticas, gravidez ectópica e para o aborto voluntário em países onde este procedimento é permitido (em associação ao misoprostol) (Hyouun *et al.*, 2012; van Mello *et al.*, 2012; Albomaali *et al.*, 2013; Rana *et al.*, 2013; Winter MC, 2021; Zarou *et al.*, 2021). Uma série de casos sugere o uso para tratamento conservador de distúrbios aderentes da placenta, na dose de 70 mg/m<sup>2</sup>, antes da embolização das artérias uterinas (Babaei *et al.*, 2019). Para o tratamento da psoríase ou da artrite reumatóide, a dose utilizada é de 7,5 a 20 mg/semana (Hyouun *et al.*, 2012) e na gravidez ectópica pode ser utilizado regime de dose única ou multidoses (Rana *et al.*, 2013; van Mello *et al.*, 2012). É uma droga com aplicabilidade consagrada, sendo considerada de primeira linha no tratamento da artrite reumatóide (Kremer *et al.*, 2004; Padjen *et al.*, 2020; Hannoodee & Mittal, 2021; Sherbini *et al.*, 2021).

### 1.2.2 Perfil de toxicidade

A limitação da terapia com metotrexato é representada pelas reações adversas, que ocorrem em 5 a 35% dos pacientes em tratamento prolongado (Prey *et al.*, 2009). São relatados: mielossupressão (0,6 a 4%), manifestações gastrointestinais, como náuseas, vômitos, úlceras orais e inapetência (0,01 a 4%), queda de cabelo (0,2%), pneumonites (0,4 a 0,8%), alterações no sistema nervoso central (1 a 3,7%), déficit da função renal (0,4 a 1,4%), perda de peso (1%), aumento de enzimas hepáticas (3,2 a 4%), rash cutâneo (0,02%) (Dervieux *et al.*, 2004; Prey *et al.*, 2009; Varatharajan *et al.*, 2009; Hyoun *et al.*, 2012; Padjen *et al.*, 2020; Hannoodee & Mittal, 2021). Uma revisão sistemática sobre a suplementação com ácido fólico demonstrou redução dos efeitos colaterais hepáticos, mas seu uso pode requerer maiores doses de metotrexato em alguns pacientes, para a obtenção de eficácia clínica (Prey *et al.*, 2009).

O uso do metotrexato está associado a taxas relevantes de abandono do tratamento atribuído aos efeitos colaterais da droga (Hider *et al.*, 2009; Varatharajan *et al.*, 2009; Lopez-Olivo *et al.*, 2014; Sherbini *et al.*, 2021), especialmente os sintomas gastrointestinais, que foram o efeito adverso mais comumente observado (Varatharajan *et al.*, 2009; Sherbini *et al.*, 2021).

O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) recomenda, antes de iniciar o tratamento da artrite reumatóide com metotrexato, que se realize testes sanguíneos hepáticos, incluindo dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, albumina e bilirrubinas, sorologias para hepatite B e C, hemograma e creatinina. O seguimento deve ser feito a cada 2 a 4 semanas nos primeiros três meses com hemograma, transaminases (AST e ALT) e creatinina. De 3 a 6 meses do início da terapia, o intervalo entre a monitorização passa a ser de 8 a 12 semanas; após 6 meses do uso da droga, o intervalo indicado é de 12 semanas (Singh *et al.*, 2016). A biópsia hepática deve ser considerada se o paciente desenvolver anormalidades persistentes nos testes sanguíneos de função hepática, hepatites B e C crônicas ou antecedente de uso excessivo de álcool (Kremer *et al.*, 1994; Hannoodee & Mittal, 2021). Em artigo de revisão publicado recentemente, a recomendação é

a realização dos exames mencionados semanalmente no primeiro mês e a cada dois meses após, e também a realização de triagem para tuberculose nos países endêmicos (Hannoodde & Mittal, 2021).

Já os efeitos colaterais relatados para a dose única de metotrexato no tratamento de gravidez ectópica são brandos e autolimitados (Oron *et al.*, 2013; Hendriks *et al.*, 2020). Os mais comuns são conjuntivite e estomatite aftosa. Outros incluem sintomas gastrointestinais e, raramente, pneumonia, dermatite, supressão da medula óssea, aumento das enzimas hepáticas ou alopecia (Oron *et al.*, 2013; Hendriks *et al.*, 2020).

### **1.2.3 Contraindicações**

As contraindicações ao tratamento com metotrexato são: gestação, amamentação, imunodeficiência, alcoolismo, doença hepática crônica, discrasia sanguínea preexistente, sensibilidade conhecida ao metotrexato, doença pulmonar ativa, úlcera péptica, disfunções hepáticas, renais ou hematológicas e pacientes submetidas à radioterapia (Oron *et al.*, 2013; Barnhart *et al.*, 2000; Hannoodde & Mittal, 2021).

### **1.2.4 Impacto reprodutivo**

Estudos em ratos e macacos mostraram que a embriofetalidade parece ser mais comum do que a teratogênese com o uso da droga durante a gravidez (Hyoun *et al.*, 2012). Em humanos, os estudos baseiam-se em relatos e séries de casos, muitas vezes com o uso concomitante de outras drogas, diferentes regimes de doses e em idades gestacionais diversas, sendo difícil estabelecer critérios comparativos com a incidência de malformações na população em geral (Hyoun *et al.*, 2012). Parece haver concordância na maioria dos casos no que diz respeito ao período de exposição mais suscetível ao desenvolvimento da embriopatia associada à droga, que seria entre 6 e 8 semanas após a concepção, em doses iguais ou superiores a 10 mg/semana (Feldkamp *et al.*, 1993; Hyoun *et al.*, 2012). Entre as malformações associadas, encontram-se hérnia umbilical, dolicocefalia, alveolite fibrosante, atresia de válvula pulmonar,

anencefalia, craniossinostose, microcefalia, tetralogia de Fallot, deficiências em membros e sindactilia (Walden *et al.*, 1979; Hyoun *et al.*, 2012; Verbene *et al.*, 2019). Há um estudo de revisão publicado anteriormente que é enfático no papel teratogênico da droga (Lloyd *et al.*, 1999). Outro estudo retrospectivo, que avaliou o grupo de drogas inibidoras da DHFR sem individualizar o metotrexato, encontrou aumento no risco de defeitos cardiovasculares e fendas orais, quando a exposição se deu no segundo ou terceiro mês após a data da última menstruação (Hernández-Díaz *et al.*, 2000).

Um artigo de revisão sobre os efeitos da droga na gravidez, fertilidade e lactação recomenda *washout* de 6 meses, levando em consideração as recomendações do fabricante (Lloyd *et al.*, 1999). Recomendações mais atuais orientam aguardar pelo menos 1 a 3 meses após interrupção da medicação para a concepção e que as tentantes devem ser suplementadas com ácido fólico (Janssen *et al.*, 2000; Padjen *et al.*, 2020).

Em relação à fertilidade, estudo prospectivo com 1064 mulheres que comparou os resultados do tratamento de gravidez ectópica realizado com salpingectomia, salpingostomia e metotrexato, não demonstrou prejuízo da fertilidade com o uso da droga, em comparação aos outros métodos, sendo que no subgrupo de pacientes com outros fatores de risco para infertilidade (idade >35 anos, doença tubária, história de infertilidade), o tratamento conservador mostrou-se superior quando se analisou a taxa posterior de gravidez intrauterina (de Bennetot *et al.*, 2012). É considerado uma quimioterapia de baixo risco para a preservação da fertilidade, com manutenção usual da regularidade dos ciclos menstruais e sem alterar os níveis de hormônio anti-mülleriano (AMH) antes e após o seu uso no tratamento clínico de gravidez ectópica (Oriol *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2020). Em ciclos de FIV realizados após o tratamento com a droga, não se observou nenhuma diferença na quantidade de gonadotrofinas necessárias para o estímulo, nos picos de estradiol, no número de oócitos recuperados ou no número total de embriões obtidos, além da taxa de implantação manter-se na média esperada para esse tipo de tratamento (Oriol *et al.*, 2008). Concluiu-se, portanto, que o uso do metotrexato em regime de dose única não teve impacto na reserva ovariana, sendo uma droga segura para o uso

nesse regime em pacientes com desejo reprodutivo (Oriol *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2020). Outro estudo que avaliou o uso da droga no tratamento de doença trofoblástica gestacional mostrou também não haver influência na performance reprodutiva após o tratamento (Woolas *et al.*, 1998).

### 1.2.5 Metotrexato e Endometriose

Células estromais e epiteliais de endometriomas ovarianos e de implantes de endometriose profunda foram cultivadas *in vitro* e avaliadas em comparação ao endométrio de controles sem a doença, quanto à atividade proliferativa, sendo encontradas taxas de proliferação 50%, 63%, 87% e 74% maiores do que nas células controles, respectivamente. O aumento da atividade proliferativa na endometriose, sugerido por esse estudo, sinaliza para um possível benefício no uso de drogas antiproliferativas no tratamento desta afecção (Ngô *et al.*, 2010).

Há poucos dados do uso de metotrexato em pacientes com endometriose e se referem ao uso em endometriomas ovarianos, com aplicações locais da droga. Em estudo publicado em 2007, que avaliou 14 pacientes com endometriomas recorrentes submetidas à drenagem guiada por ultrassonografia, seguida da injeção de 30 mg de metotrexato intracisto, encontrou-se taxa de 28,6% de recidiva (Agostini *et al.*, 2007). A realização apenas da drenagem guiada por ultrassonografia apresentou taxa de recorrência de 53% (Giorlandino *et al.*, 1993), sendo a injeção de metotrexato após a aspiração do cisto, portanto, uma alternativa sugerida, apesar do pequeno número de pacientes, com o intuito de se evitar ou postergar o procedimento cirúrgico (Agostini *et al.*, 2007).

Outro estudo, com desenho semelhante, encontrou taxa de resolução com o procedimento de 84,6% (em 1, 2 ou 3 punções), com 15,4% de recidiva (Mesogitis *et al.*, 2005). Um terceiro estudo, que também realizou aspiração de endometriomas unilaterais e injeção de metotrexato, em 65 pacientes, buscou avaliar o impacto deste procedimento na resposta ovariana e no resultado reprodutivo de pacientes submetidas à ciclos de FIV (Shawki *et al.*, 2012). Não houve diferença estatisticamente significativa no número de oócitos recuperados, taxa de fertilização e qualidade dos embriões obtidos do ovário tratado em relação ao ovário contralateral, nem houve diferença na característica

e qualidade endometrial após exposição. O estudo também demonstrou taxa cumulativa de gravidez de 48% e nenhuma anormalidade congênita foi detectada nos exames de ultrassom (US) realizados durante a gestação e nem no exame clínico após o parto, concluindo que não houve comprometimento do resultado reprodutivo após uso da droga na dose utilizada (Shawki *et al.*, 2012).

Quando buscou-se avaliar a resposta quanto à diminuição da atividade proliferativa *in vitro* com o uso de metotrexato em cultura de células endometrióticas, não se observou nenhum efeito com as concentrações da droga utilizadas (1 mM, 100µM e 10µM). A droga não foi testada *in vivo* nesse estudo (Ngô *et al.*, 2010).

Na tentativa de maximizar a ação local do metotrexato nos tecidos afetados pela doença, reduzindo efeitos colaterais e diminuindo resistência à droga, optamos pela utilização da droga acoplada a uma nanoemulsão lipídica, em sistema de *delivery*, como veremos a seguir.

### **1.3 Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e Nanoemulsão Lipídica (LDE)**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são as principais carreadoras de colesterol do plasma (Pinheiro *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007). Essas lipoproteínas são removidas da circulação para as células por meio de receptores específicos da membrana plasmática, que reconhecem a apolipoproteína B100 (apoB100), única molécula de proteína presente na LDL (Graziani *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007). Quando acoplado ao receptor específico na membrana da célula, o LDL é internalizado em vesículas, que se fundem em lisossomos. Estes sofrem desidratação e, com a consequente ruptura dessas vesículas, os lípidos e os aminoácidos da apoB100 são lançados no citoplasma (Graziani *et al.*, 2002).

Muitos estudos evidenciaram a superexpressão de receptores de LDL em diversas linhagens de células tumorais (Ho *et al.*, 1978; Graziani *et al.*, 2002), devido à maior necessidade de colesterol para a síntese de membranas, consequente à proliferação acelerada de células malignas (Maranhão *et al.*,

1994). Esta descoberta levou à possibilidade do uso do LDL como um carreador de quimioterápicos para o tratamento de diversos tipos de tumores, promovendo um efeito sítio-específico, reduzindo os efeitos colaterais da ação da droga em células saudáveis sem, no entanto, perder o efeito citotóxico da mesma (Maranhão *et al.*, 1994). Graziani *et al.* desenvolveram uma emulsão composta basicamente por fosfolipídeos e ésteres de colesterol (LDE), com estrutura similar à porção lipídica do LDL. A apolipoproteína E (apo E), adquirida pela LDE, quando em contato com o plasma, serve de ligante da emulsão com os receptores de LDL (Graziani *et al.*, 2002). A LDE tornou-se, assim, um dispositivo adequado para carrear moléculas de drogas para o tratamento de diversos tipos de cânceres, devido à internalização deste complexo droga-emulsão, mediado pelos receptores de LDL (Graziani *et al.*, 2002). Neste contexto, vários estudos foram realizados, comprovando a captação aumentada do LDE em tecidos neoplásicos (Guido *et al.*, 2022), e comparando a farmacocinética da apresentação habitual de quimioterápicos com a mesma droga acoplada à LDE, ressaltando os benefícios principalmente com relação à redução dos efeitos colaterais (Maranhão *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005).

Nesse sentido, em 2017, Gibran *et al.*, observou que implantes de endometriose profunda intestinal também apresentavam superexpressão de receptores para esta lipoproteína, à semelhança de tumores malignos, tanto em relação à controles saudáveis, quanto em comparação com o endométrio tópico das pacientes com endometriose (Gibran *et al.*, 2017).

Posteriormente, outro estudo (Bedin *et al.*, 2019) buscou determinar se esses receptores de LDL, superexpressos nos focos de endometriose, seriam capazes de absorver o LDE marcado com carbono-14. A conclusão foi que esse composto foi captado pelo tecido endometriótico de pacientes portadoras de focos de endometriose profunda e ovariana, pelo peritônio saudável adjacente às lesões e pelo endométrio. As lesões intestinais captaram menos do que as não-intestinais, provavelmente devido ao maior componente fibrótico das lesões observadas nesta localização.

Ambos os estudos sinalizaram para a possibilidade de desenvolvimento de terapia sítio-específica para o tratamento de endometriose profunda,

utilizando o complexo droga-LDE, como opção terapêutica ao uso de bloqueadores hormonais e às cirurgias radicais, com possíveis vantagens farmacocinéticas e redução expressiva de efeitos colaterais, conforme detalharemos a seguir.

#### 1.4 Composto LDE-MTX

Com o objetivo de diminuir a toxicidade e aumentar a concentração do quimioterápico nos tecidos com super-expressão dos receptores de LDL, Moura *et al.* desenvolveram uma nova formulação, utilizando um derivado lipofílico do metotrexato (MTX) associado a uma nanoemulsão lipídica (LDE-MTX) (Moura *et al.*, 2011).

O complexo LDE-MTX reúne as prerrogativas necessárias ao seu amplo uso: primeiramente, é estável e os procedimentos necessários para a sua síntese são relativamente fáceis de executar, não requerem reagentes caros e podem ser facilmente adaptáveis para a produção em larga escala (Moura *et al.*, 2011). Além disso, o LDE-MTX se assemelha a outros complexos droga-nanoemulsão, como o paclitaxel, o etoposide e a carmustina, que mostraram habilidade em reduzir expressivamente a toxicidade relacionada a esses quimioterápicos, com ação farmacológica preservada e até melhorada (Maranhão *et al.*, 2002; Valduga *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2011; Kretzer *et al.*, 2012).

Receptores de LDL apresentam um mecanismo de internalização muito mais eficiente para a captação do metotrexato do que os receptores de folato. A melhor captação do LDE-MTX leva a um nível muito superior de citotoxicidade em comparação à forma comercial, oferecendo um eficiente mecanismo através do qual se pode otimizar a ação farmacológica da droga (Moura *et al.*, 2011).

O composto LDE-MTX apresentou citotoxicidade muito superior ao metotrexato em culturas de células humanas eritroleucêmicas (K562) e células humanas leucêmicas promielocíticas (HL60). Para as primeiras, a citotoxicidade foi dez vezes maior e, para a segunda, 100 vezes maior. A captação do LDE-MTX por ambas as células também foi superior. A concentração de droga



necessária para inibir o crescimento de 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi muito menor para o composto LDE-MTX, em relação à formulação comercial do metotrexato (Moura *et al.*, 2011).

Essa otimização da captação do metotrexato resulta na potencialização da ação farmacológica da droga, vantagem demonstrada em estudos com animais, para o tratamento de artrite (Mello *et al.*, 2013), aterosclerose (Bulgarelli *et al.*, 2013) e, mais recentemente, para a prevenção de dilatação aórtica em modelos murinos de síndrome de Marfan (Guido *et al.*, 2022). No tratamento de aterosclerose em animais foi demonstrado, além do benefício terapêutico, uma drástica diminuição da toxicidade, com uma leve redução na contagem de eritrócitos nos animais tratados, em comparação à queda de 40% de eritrócitos descrita para a forma usual da droga (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Desta forma, conclui-se que o LDE-MTX é virtualmente completo, estável e apresenta citotoxicidade equivalente ou superior ao metotrexato (Moura *et al.*, 2011), sendo uma alternativa para a melhora da eficácia e do perfil de toxicidade da droga no tratamento de diversas afecções.

## 1.5 Hipótese do estudo

Em 2000, Thomas e Campbell publicaram um artigo sobre aspectos do comportamento da endometriose que seriam semelhantes ao de doenças malignas. Como exemplo citam que, como o câncer, a endometriose também pode ser tanto uma doença localizada, quanto apresentar focos à distância, semelhante a metástases e é munida também da capacidade de aderir, invadir e destruir outros tecidos (Thomas & Campbell, 2000). Os focos da doença apresentam resistência à apoptose e promovem um ambiente inflamatório crônico (Kvaskoff *et al.*, 2021), podendo ser um mecanismo implicado na carcinogênese em pacientes com a doença (Leenen *et al.*, 2021). Linfangiogênese e focos de endometriose em linfonodos também foram demonstrados (Abrão *et al.*, 2006; Samartzis *et al.*, 2020). Além das semelhanças comportamentais, estudos demonstraram que as lesões de endometriose exibem mutações em genes que são diretamente relacionadas a neoplasias (Siufi Neto *et al.*, 2014). No entanto, em contraste com o câncer, o

foco de endometriose é semelhante em morfologia ao endométrio tópico, não confere letalidade à portadora e não progride ou induz a metástases como uma massa expansiva maligna (Samartzis *et al.*, 2020).

Esses dados levam à hipótese de bases fisiopatológicas comuns entre neoplasias malignas e endometriose profunda, permitindo inferir que tratamentos semelhantes aos aplicados a tumores ginecológicos poderiam ter ação benéfica nesta afecção. Conforme citado anteriormente, o estudo publicado por Gibran *et al.*, demonstrou haver maior expressão gênica de receptores de LDL na membrana celular de focos de endometriose profunda intestinal e, dentro da mesma linha de pesquisa, comprovou-se a absorção de LDE marcado com carbono 14 pelos focos de endometriose (Bedin *et al.*, 2019). O próximo passo envolve a terapia alvo com quimioterápicos acoplados à nanoemulsão lipídica, a qual poderia representar alternativa terapêutica de sucesso no tratamento dos focos e nódulos endometrióticos, à semelhança do que ocorre nas neoplasias malignas, que já foram testadas com essa forma terapêutica, resultando em pouco efeito nas células saudáveis e, ainda, mínimos efeitos colaterais sistêmicos.

Nesse sentido, o metotrexato, por ser uma droga de ação antiproliferativa e imunossupressora, com atividade antiinflamatória, e eficácia já demonstrada em tumores e também em doenças benignas, pode ser uma alternativa como droga para o tratamento clínico da endometriose, doença de característica ao mesmo tempo proliferativa e inflamatória.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia do tratamento da dor pélvica em pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal com o uso de droga antiproliferativa (metotrexato) acoplado à nanoemulsão lipídica (LDE).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Comparar os níveis de dor pélvica antes e depois do tratamento em tempos distintos (30, 60, 90 e 180 dias);
- ✓ Avaliar a resposta terapêutica com diferentes doses de metotrexato;
- ✓ Avaliar a incidência de efeitos colaterais associados ao tratamento;
- ✓ Comparar os dados de imagem das lesões profundas intestinais descritas no ultrassom pélvico e transvaginal com preparo intestinal antes e depois do tratamento em tempos distintos (30 e 180 dias);
- ✓ Comparar os níveis de hormônio anti-mülleriano (AMH), antes e depois de 180 dias do tratamento.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Tipo do estudo**

Trata-se de estudo fase I/II relativo ao uso de metotrexato vetorizado em nanoemulsão lipídica para o tratamento da endometriose profunda intestinal de pacientes com queixa de dor pélvica, que poderia ser referida como dismenorreia, dispareunia de profundidade, dor pélvica acíclica e disquezia durante o período menstrual e/ou disúria durante o período menstrual. Pelo menos uma das queixas deveria ser referida com nota maior ou igual a 7 na escala visual analógica de dor (Maxwell *et al.*, 1978) e o ultrassom pélvico e transvaginal com preparo intestinal deveria ser comprobatório da presença de endometriose profunda intestinal, acometendo pelo menos a camada muscular própria (Chapron *et al.*, 2003; Vercellini *et al.*, 2018).

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

O estudo foi realizado, em conjunto, pelo setor de Endometriose da divisão de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo Laboratório de Metabolismo e Lípidos do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo Núcleo de Endoscopia Ginecológica e Endometriose do Hospital Pérola Byington – Centro de Referência da Saúde da Mulher e pelo Laboratório Alta – Excelência Diagnóstica, com sede em São Paulo.

#### **3.3 Princípios Éticos**

A aplicação do fármaco respeitou os princípios éticos de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos das instituições mencionadas acima:

- ✓ Hospital Pérola Byington – número do parecer: 1.937.704 (Anexo A);

- ✓ FMUSP – número do parecer: 3.402.300 (Anexo B).

As aplicações respeitaram também os protocolos técnicos do hospital e dos médicos envolvidos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) contribuiu para a realização deste estudo com verba aprovada no processo 2014/03742-0.

O estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), com o código RBR-7jx2bj.

### 3.4 Critérios de Inclusão

- ✓ Mulheres com idade entre 30 e 50 anos;
- ✓ Menacme;
- ✓ Ausência de desejo reprodutivo;
- ✓ Endometriose profunda intestinal comprovada por USTV com preparo intestinal, acometendo pelo menos a camada muscular própria;
- ✓ Presença de dor pélvica referida como dismenorreia, dispareunia de profundidade, dor pélvica acíclica, disquezia durante o período menstrual e/ou disúria durante o período menstrual. Pelo menos uma das queixas referidas com nota maior ou igual a 7 na escala visual analógica de dor (EVA) (Maxwell *et al.*, 1978) (Anexo C);
- ✓ Não utilização de terapêutica hormonal nos 6 meses que antecederem o tratamento com metotrexato, no caso de análogos de GnRH e progestagênios, e 3 meses para contraceptivos hormonais combinados orais, ou manutenção de queixa álgica relevante (EVA  $\geq$  7), apesar do tratamento clínico;
- ✓ Confirmação de não-gravidez por meio de beta-hcg, colhido até 48 horas antes da administração da medicação.

### 3.5 Critérios de exclusão

- ✓ Amamentação;
- ✓ Imunodeficiência, alcoolismo, úlcera péptica, disfunções hepáticas, renais ou hematológicas, doença pulmonar ativa, neoplasias malignas e sensibilidade conhecida ao metotrexato.

### 3.6 Pacientes

As pacientes inicialmente seriam randomizadas em três grupos para receberem doses escalonadas do metotrexato associado à nanoemulsão lipídica. Foram inicialmente selecionadas 22 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão. Todas as pacientes foram previamente informadas acerca dos riscos do uso da medicação e possíveis efeitos colaterais. Após esclarecidas as dúvidas, as candidatas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo D). Todas as pacientes encontravam-se em seguimento no Ambulatório de Endometriose Intestinal do Hospital Pérola Byington e estavam aguardando cirurgia para tratamento da endometriose profunda e intestinal, por falha parcial ou completa do tratamento clínico. Por se tratar de um estudo piloto, não foi realizado cálculo amostral.

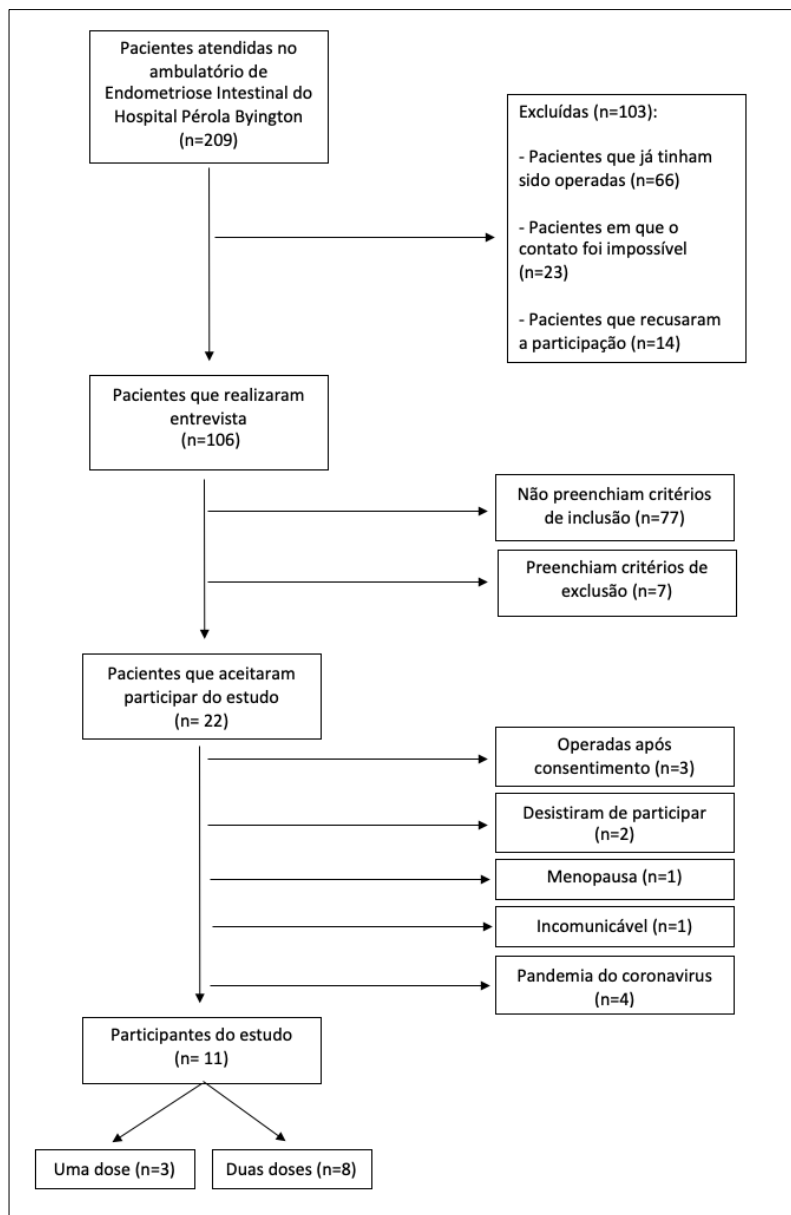
### 3.7 Dinâmica do estudo

Duzentas e nove pacientes que estavam em seguimento ambulatorial por endometriose intestinal foram contatadas por telefone, com o intuito de serem convidadas a vir ao Hospital Pérola Byington para conversar a respeito do projeto. Não foi possível o contato com vinte e três, após tentativas em dias e horários diferentes, e pesquisa em cadastro hospitalar. Das que conseguimos contatar por telefone, 14 pacientes recusaram prontamente a participação e 66 pacientes já tinham sido operadas em outros serviços. Foram entrevistadas 106 pacientes, das quais 77 não preenchiam os critérios de inclusão e 7 pacientes foram excluídas devido aos critérios de exclusão. Vinte e duas pacientes aceitaram participar da pesquisa, porém, no decorrer do tempo antes do início do estudo, três pacientes foram chamadas para cirurgia e operadas no serviço e

duas desistiram. Restaram, portanto, 17 pacientes candidatas à participação (Figura 1).

As pacientes classificadas para compor os três grupos foram submetidas à investigação criteriosa da presença de endometriose por meio de anamnese, exame físico e ultrassonografia pélvica e transvaginal com preparo intestinal e selecionadas de acordo com os critérios de inclusão.

**Figura 1** - Fluxograma de seleção de pacientes para participação na pesquisa



As pacientes candidatas ao estudo foram convidadas para entrevista presencial, quando detalhes do projeto foram abordados, assim como a exposição de riscos e benefícios. Para as pacientes com interesse em participar, foi entregue o termo de consentimento livre e esclarecido e, após ciência do mesmo, as pacientes foram ativamente investigadas quanto às queixas álgicas e antecedentes pessoais. Todas as pacientes foram submetidas a exame ginecológico e foram realizadas as medidas antropométricas (peso e altura), com cálculo do índice de massa corpórea (IMC).

O exame abdominal tinha como finalidade avaliar a presença de dor e identificar a presença de massas. Para o exame especular, o objetivo era avaliar a presença de nodulações em fundo de saco posterior ou vagina, que atingissem mucosa ou submucosa, as quais seriam identificadas como áreas nodulares azuladas ou arroxeadas. Ao toque vaginal, o objetivo era avaliar a mobilidade uterina, identificar a presença de nódulos ou espessamentos, dolorosos em fundo de saco posterior, região retrocervical e paracervical, ligamentos uterossacros direito e esquerdo, em parede posterior vaginal, sugerindo acometimento do septo retovaginal, assim como parede anterior vaginal, sugerindo acometimento de parede posterior da bexiga. A presença de massa sugestiva de acometimento ovariano também foi considerada (Eskenazi *et al.*, 2001; Abrão *et al.*, 2007; Bazot *et al.*, 2009; Hudelist *et al.*, 2011a; Saccardi *et al.*, 2012).

Após esta etapa, as pacientes realizaram dosagem sérica de FSH, LH, prolactina, hormônio tireoestimulante (TSH), T4 livre, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, albumina, bilirrubinas, sorologias para hepatite B e C, sorologia para HIV, hemograma completo, uréia e creatinina. Neste momento, uma paciente foi excluída por apresentar FSH de 82,81, indicando proximidade da menopausa.

Ao cumprirem os critérios de inclusão e exclusão, as pacientes foram randomizadas em 3 grupos cuja diferença seria a quantidade de doses de metotrexato utilizadas. Das quinze pacientes previstas inicialmente, 5 iriam compor o grupo 1, que receberia dose equivalente a 50mg/m<sup>2</sup>, divididos em 2 tomadas com intervalo semanal; 5 iriam compor o grupo 2, que receberia dose



equivalente a 75mg/m<sup>2</sup>, divididos em 3 tomadas com intervalo semanal; e 5 iriam compor o grupo 3, que receberia o equivalente a 100mg/m<sup>2</sup> da droga, divididos em 4 tomadas, com intervalo semanal. A superfície corporal foi calculada pela fórmula de Du Bois, que leva em consideração peso e altura, obtidos no momento da anamnese e exame físico iniciais (Du Bois *et al.*, 1916):  $SC = (P^{0.425} \times A^{0.725}) \times 0.007184$ .

Das 16 pacientes restantes, 12 fizeram novo exame de ultrassom transvaginal com preparo intestinal antes da administração da medicação, com único médico radiologista com larga experiência na avaliação de lesões de endometriose por esta via (Dr. Manoel Orlando Gonçalves) e coautor do artigo que buscou estabelecer um consenso para avaliação sistemática da pelve por meio da ultrassonografia no mapeamento da endometriose profunda (Guerriero *et al.*, 2016). Na mesma oportunidade, foi realizada coleta de sangue para avaliação do hormônio anti-mülleriano (AMH). O mesmo profissional realizou todos os exames da pesquisa, seja antes da medicação, após 30 dias e após 180 dias. Novo exame de AMH foi colhido quando a paciente retornou para o exame de ultrassom realizado após 180 dias da administração da medicação. Das 12 pacientes que realizaram o ultrassom e dosagem de AMH, 11 receberam a medicação, uma vez que uma das pacientes ficou incomunicável quando da convocação para agendar a medicação, sendo tentado contato por telefone e por email por vários dias, sem sucesso. As 4 pacientes restantes (do total de 16 pacientes selecionadas) estavam aguardando para a realização do USTV e AMH, quando do início da medicação com o grupo inicial.

A medicação foi preparada pelo Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor, no máximo 1 semana antes da infusão e foi administrada em esquema ambulatorial nas 11 pacientes iniciais dentro do Hospital Pérola Byington, a fim de monitorar os efeitos colaterais. A medicação foi mantida sob refrigeração, no referido laboratório, identificada com o nome da paciente e com a orientação de diluição e transportada até o Hospital Pérola Byington em recipiente adequado para a manutenção da temperatura, no dia da administração. A bolsa contendo a preparação era retirada da refrigeração cerca de 20 minutos antes da infusão e diluída com soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%). A medicação foi

administrada em bomba de infusão com duração de 1 hora em acesso periférico em membro superior com abocath 20. As pacientes foram acomodadas em sala destinada para este fim dentro do setor de quimioterapia e permaneceram em observação por cerca de 1 hora após o término, a fim de monitorar efeitos colaterais imediatos. Todas as pacientes eram orientadas a entrar em contato imediatamente com o pesquisador por telefone, caso sentissem algo diferente no mesmo dia e também nos dias subsequentes.

As pacientes que receberam a medicação foram investigadas ativamente 5 dias após o evento quanto à presença de efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia, fadiga, tontura, sonolência e queda de cabelos.

Como descrito, a programação inicial era dividir as pacientes em três grupos, com a dose escalonada mencionada anteriormente. No entanto, das 11 pacientes que iniciaram a administração da medicação, 8 pacientes realizaram duas doses com intervalo semanal e 3 pacientes realizaram apenas uma dose. Isto ocorreu porque, no momento da segunda semana de administração da medicação, iniciaram as medidas restritivas de circulação de pessoas pela pandemia pelo coronavírus, e o Hospital Pérola Byington foi convertido em local de referência estadual para atendimento de casos suspeitos. Todos os procedimentos cirúrgicos e ambulatoriais, bem como atendimentos foram suspensos, exceto o tratamento de pacientes oncológicas.

Aliado a isso, tivemos as medidas restritivas no funcionamento de transportes públicos. A equipe da pesquisa decidiu interromper a administração da medicação para não expor as pacientes ao risco de circular em hospital referência para atendimento de casos de coronavírus e também pela atividade imunossupressora descrita da droga, o que poderia predispô-las a desenvolver quadros mais graves diante de uma possível contaminação. Essa decisão foi tomada no intuito de garantir a segurança destas pacientes, que aceitaram participar da pesquisa.

Diante do exposto e da suspensão da administração da medicação, as quatro pacientes restantes, que não haviam ainda realizado o ultrassom com preparo pertinente à pesquisa, foram orientadas acerca da suspensão das atividades propostas inicialmente e seguiram com o tratamento habitual.

A proposta inicial era de que as pacientes retornariam para consulta após 30, 90, 120 e 180 dias do final da administração da droga para comparar os sintomas com os referidos anteriormente ao tratamento. Esta análise comparativa utilizou a escala visual analógica de dor (EVA) para determinação quantitativa. O retorno de 30 dias foi suspenso pelo pico do número de casos de covid em São Paulo, impossibilidade de uso do espaço físico do Hospital Pérola Byington para esta finalidade e pelo fato da pesquisadora estar em convalescença da infecção por coronavírus, em isolamento domiciliar.

As 11 pacientes que receberam a medicação (uma ou duas doses) realizaram USTV com preparo intestinal após 30 e 180 dias do tratamento, por se tratar de serviço externo particular, com fluxo menor de pessoas e adepto de todas as medidas de segurança recomendadas. As medidas dos nódulos inicialmente encontrados foram reavaliadas para determinar o comportamento dos mesmos após a medicação por meio da análise de extensão e profundidade das lesões.

As pacientes repetiram as dosagens de FSH, LH, prolactina, TSH e T4 livre após 90 e 180 dias, para determinar se o uso de droga antiproliferativa promoveu quaisquer danos funcionais à hipófise, tireóide e ovários. Dosagens subsequentes dos testes sanguíneos hepáticos (ALT, AST, fosfatase alcalina, albumina, bilirrubinas), hemograma completo, uréia e creatinina foram realizadas nas mesmas oportunidades, após a infusão da emulsão, com o objetivo de monitorar a toxicidade ao tratamento. A coleta de exames 15 dias após, inicialmente prevista, também foi suspensa pelo momento da pandemia e pela recusa de muitas pacientes em se deslocar ao hospital naquele momento. O risco de toxicidade esperado era baixo, uma vez que a dose máxima utilizada foi a dose correspondente à utilizada no tratamento de gestação ectópica tubária. A dosagem do hormônio anti-mülleriano foi repetida após 180 dias da administração da medicação, para avaliar se houve impacto na reserva ovariana das pacientes, na oportunidade da realização do último exame de ultrassom.

O exame físico foi repetido pelo mesmo examinador (R.A-T.) após 180 dias.

### 3.8 Ultrassom Transvaginal com Preparo Intestinal

O exame de ultrassom com preparo intestinal baseou-se no protocolo publicado em 2009 por Gonçalves *et al.*, que orienta que a avaliação de endometriose seja realizada de forma sistemática em todas as pacientes, mapeando todos os sítios: rins e diafragma direito, fossa ilíaca esquerda, com avaliação do sigmóide, fossa ilíaca direita, com avaliação de apêndice, íleo e ceco, pelve, avaliando útero, ovários, reto, sigmóide, bexiga, regiões periuterinas e fundo de saco, além de avaliar a presença de processos aderenciais (Gonçalves *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010). Todos os exames foram realizados no aparelho Voluson E 10 da GE (General Electric), com os transdutores convexo de abdome, linear de alta resolução e transvaginal, em correspondência com a área examinada.

Todas as pacientes realizaram preparo intestinal prévio com a ingestão de bisacodil 5 mg no dia anterior ao exame e aplicação retal de solução de fosfato de sódio mono e dibásico, 2 horas antes da realização do exame. Após o uso desta medicação, a paciente permanecia em jejum.

Foram consideradas lesões intestinais por endometriose os espessamentos segmentares da parede do reto e sigmóide que apresentavam textura hipocóide, forma irregular e comprometiam a alça externa para internamente. As pacientes selecionadas, conforme mencionado anteriormente, tinham lesão que acometia pelo menos a camada muscular própria.

### 3.9 Síntese do derivado de MTX e preparação do LDE-MTX

O metotrexato (4,0 mmol) foi diluído em dimetilsulfóxido. Em seguida, foram adicionados carbonato de césio (4,4 mmol) e brometo de dodecila (10,0 mmol). Após 24 horas de agitação à temperatura ambiente, foram adicionados 100 mL de água e o produto foi extraído com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada (Rosowsky *et al.*, 1984).

A nanopartícula lipídica foi preparada a partir de uma mistura de lípides constituída por fosfatidilcolina, oleato de colesterol, colesterol livre e trioleína. (Maranhão *et al.*, 1993) e a associação com o metotrexato foi realizada conforme descrito previamente (Moura *et al.*, 2011). A emulsão formada foi centrifugada a 3700rpm, por 20 minutos e esterilizada em filtro de polycarbonato 0,22µm em fluxo laminar, e armazenada em frascos estéreis a 4°C.

A taxa de associação do metotrexato à nanopartícula foi determinada através de quantificação por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) (Nexera X2, Shimadzu, Tóquio, Japão).

### 3.10 Análise Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas, com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e estatísticas descritivas das variáveis numéricas, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis.

Para comparar variáveis numéricas principais (sintomas clínicos, exames de imagem e exames laboratoriais) entre os tempos avaliados, utilizamos o modelo linear misto (*linear mixed model*) ou GEE (*Generalized Estimating Equations*). As variáveis foram transformadas em ranks devido à ausência de distribuição normal.

Para comparar os efeitos das doses (uma ou duas doses da medicação) em relação à mudança nos sintomas clínicos, medidas da lesão intestinal e das outras lesões de endometriose e parâmetros laboratoriais ao longo do tempo, também foi utilizado modelo linear misto (*linear mixed model*) ou GEE (*Generalized Estimating Equations*). Os dados de sintomas clínicos, exames de imagem e exames laboratoriais foram considerados como parâmetros principais; as diferentes doses da medicação (uma ou duas doses) foram consideradas como efeitos fixos e o paciente como efeito aleatório. Este modelo de análise permite lidar com dados faltantes em estudos longitudinais, e inclui dados de todos os pacientes, mesmo que cada paciente não tenha sido avaliada em todos

os momentos previamente estabelecidos (Conover & Iman, 1981; Liang & Zeger, 1986; Follmann & Wu, 1995; Baia, 1997; Abrao *et al.*, 2021).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ . Para análise estatística foi utilizado o programa computacional *The SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.2. (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação pré-medicação

#### 4.1.1 Características físicas das pacientes

As mulheres selecionadas para o presente estudo apresentavam média de idade de 40 anos, variando de 30 a 47 anos (Tabela 1). Nenhuma das mulheres selecionadas tinha desejo reprodutivo, conforme previsto nos critérios de inclusão mencionados.

**Tabela 1** – Características gerais das pacientes incluídas na pesquisa

	<i>n</i>	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	11	40	± 5,07	30	47
Peso (Kg)	11	68,44	± 17,19	40,5	108,1
Altura (m)	11	1,62	± 0,05	1,56	1,75
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	11	26,16	± 6,50	15,24	40,68
Gestação	11	1,18	± 1,40	0	5
Paridade	11	0,82	± 1,17	0	4
Aborto	11	0,36	± 0,67	0	2

IMC: índice de massa corpórea

#### 4.1.2 Quadro clínico

Oito pacientes (72,73%) faziam uso de medicação hormonal, porém mantendo sintomatologia algica significativa, sendo os progestagênios a classe de medicação mais utilizada (Tabela 2).

**Tabela 2** – Tipos de medicação hormonal utilizadas para tratamento da endometriose pelas pacientes incluídas na pesquisa

	<i>n</i>	%
<b>Progestagênio (n=6)</b>		<b>54,54</b>
Dienogeste	2	18,18
Desogestrel	3	27,27
Progesterona bioidêntica	1	9,09
<b>Combinado (E+P) (n=2)</b>		<b>18,18</b>
COC	1	9,09
Anel vaginal	1	9,09
<b>Nenhuma (n=3)</b>		<b>27,27</b>
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>100</b>

E+P: estrogênio + progestagênio. COC: Contraceptivo Oral Combinado.

Nove pacientes utilizavam medicação analgésica com frequência para controle da dor, sendo que oito pacientes utilizavam até três tipos de drogas diferentes e uma paciente fazia uso de oito medicações não-hormonais diferentes para o controle da sintomatologia álgica (Tabela 3).

**Tabela 3** – Tipos de medicação não-hormonal\* utilizadas para alívio dos sintomas álgicos pelas pacientes incluídas na pesquisa

	<i>n</i>	%
AINE	5	55,55
Antiespasmódico	4	44,44
Analgésico não-opióide	3	33,33
Opióide	3	33,33
Glicocorticóide	2	22,22
Antidepressivo tricíclico	1	11,11
Relaxante muscular	1	11,11

\*Mais de uma opção terapêutica poderia ser utilizada.  
AINE: Anti-inflamatório Não-Esteroidal

Todas as onze pacientes apresentavam queixa dolorosa significativa (EVA  $\geq$  7) em pelo menos um dos domínios pesquisados (dismenorreia,



dispareunia, dor pélvica acíclica, disquezia ou disúria), sendo que nove pacientes apresentavam pelo menos três tipos de queixa dolorosa (Tabela 4).

**Tabela 4** – Quadro clínico referido pelas pacientes incluídas na pesquisa antes da medicação, discriminando a nota da escala visual analógica (EVA) de dor em cada item

Paciente	Dismenorréia	Dispareunia	Dor Acíclica	Disquezia	Disúria
1	10	5	5	9	0
2	10	10	8	0	0
3	3	9	0	9	0
4	8	9	0	9	0
5	0	9	3	0	0
6	10	10	0	6	0
7	8	6	4	7	0
8	8	4	10	7	0
9	7	8	8	0	0
10	0	8	5	0	0
11	10	8	7	10	5

Cinco pacientes já tinham sido submetidas à procedimento cirúrgico prévio relacionado à endometriose. Destas, três tinham o antecedente de uma cirurgia prévia, uma tinha sido submetida à duas cirurgias e a outra tinha sido submetida à três cirurgias prévias para abordagem da doença. Uma das pacientes já havia realizado retossigmoidectomia previamente.

Sete das onze pacientes apresentavam alguma comorbidade prévia, porém nenhuma delas era impeditiva para a realização do estudo. As doenças referidas foram: hipertensão arterial (n=3), enxaqueca (n=2), asma (n=1) e hipotireoidismo (n=1).

#### 4.1.3 Exame físico

Nenhuma das pacientes apresentava massa abdominal palpável, mas 3 pacientes tinham dor abdominal difusa à palpação. Uma paciente apresentava lesão sugestiva de endometriose em fundo de saco de Douglas observada ao

exame especular. Todas as pacientes apresentavam toque vaginal sugestivo de doença profunda, sendo que os locais mais acometidos foram região retrocervical e paracervical (n=5) e ligamentos uterossacros (n=4). Os principais achados estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5** – Achados no exame físico pré-medicação, relacionados à presença de endometriose, nas pacientes incluídas na pesquisa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>ABDOMINE</b>											
Dor	N	N	N	N	N	N	S	S	S	N	N
Massa palpável	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>ESPECULAR</b>											
Lesão de endometriose	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
<b>TOQUE VAGINAL</b>											
Mobilidade reduzida	S	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N
Dor à mobilização cervical	N	S	S	S	N	S	S	S	N	N	S
Dor à mobilização uterina	S	N	S	S	N	N	S	N	NA	N	N
Dor/ Nódulo/ Espessamento	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fundo de Saco Posterior		S	S	S							
Retrocervical				S	S		S	S			S
Paracervical	S					S		S	S	S	
Ligamentos Uterossacros				S		S			S	S	
Septo Retovaginal											
Bexiga - Parede Posterior											
Massa anexial palpável	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S

N: não; S: sim; NA: não se aplica (paciente hysterectomizada).

#### 4.1.4 Exame de imagem

Como já descrito, o mesmo radiologista (M.O.G) realizou todos os exames das 11 pacientes nas três etapas (antes, após 30 dias e após 180 dias da infusão da medicação). O profissional não tinha conhecimento sobre o número de doses recebidas por cada paciente (Tabela 6).

Quatro pacientes (36,36%) apresentavam mais de uma lesão intestinal e as sete pacientes restantes apresentavam apenas uma lesão (63,64%). Das lesões intestinais, 54,55% (n=6) atingiam a camada muscular própria interna e 45,45% (n=5) alcançavam a submucosa. Nenhuma paciente apresentava redução da luz intestinal antes da medicação.

Dez pacientes apresentavam lesão em manto acometendo fundo de saco posterior, todas com mais de 3 cm de extensão e com profundidade média de 0,76 cm. Cinco pacientes apresentavam endometrioma ovariano, sendo que duas pacientes apresentavam endometriomas bilaterais. Para cálculo, foi considerada o valor médio entre as duas medidas do cisto, do maior endometrioma apresentado pela paciente (no caso de mais de uma lesão). A média de tamanho do maior endometrioma foi de 3,0 cm, variando de 0,85 a 4,5 cm.

**Tabela 6** – Medidas das lesões de endometriose visualizadas ao ultrassom antes da medicação

	<i>n</i>	%	Média ± DP	Mínimo	Máximo
<b>Lesão Intestinal</b>	<b>11</b>	<b>100</b>			
Longitudinal (cm)			4,77 ± 2,43	1,7	10,0
Ântero-posterior (cm)			0,85 ± 0,16	0,6	1,1
Transversal (cm)			1,76 ± 0,41	0,8	2,2
Circunferência acometida (%)			35,45 ± 8,2	16	44
<b>Lesão em Manto posterior</b>	<b>10</b>	<b>90,9</b>			
Ântero-posterior (cm)			0,76 ± 0,13	0,6	1,0
<b>Bloqueio de FSP</b>	<b>7</b>	<b>63,64</b>	---	---	---
<b>Endometrioma Ovariano (cm)</b>	<b>5</b>	<b>45,45</b>	3,0 ± 1,75	0,85	4,5
<b>Folículos Antrais</b>	<b>6</b>	<b>54,54</b>	1,67 ± 2,66	0	6
<b>Adenomiose</b>	<b>5</b>	<b>45,45</b>	---	---	---
<b>Bexiga</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	---	---	---

#### 4.2 Administração do LDE-MTX

Das 11 pacientes incluídas no estudo, 8 receberam duas doses de metotrexato acoplado à nanoemulsão lipídica e 3 receberam uma dose da

medicação. Cada dose da medicação corresponde a 25 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal e o intervalo entre as doses foi de uma semana.

Após receberem a medicação, 10 pacientes relataram pelo menos um tipo de efeito colateral, sendo que nenhum deles foi considerado grave. A frequência dos principais efeitos colaterais imediatos (imediatamente após e nas primeiras 6 horas após a infusão da medicação) e os efeitos colaterais percebidos nos primeiros cinco dias após a infusão estão detalhados na Tabela 7.

**Tabela 7** – Frequência de efeitos colaterais imediatos e tardios após administração do LDE-MTX

	Imediatos (n)	Freq (%)	Tardios (n)	Freq (%)
<b>Não</b>	<b>6</b>	<b>54,54</b>	<b>1</b>	<b>9,09</b>
<b>Sim</b>	<b>5</b>	<b>45,46</b>	<b>10</b>	<b>90,91</b>
Moleza	4	36,36	4	36,36
Tontura	2	18,18	2	18,18
Náusea	2	18,18	7	63,63
Mialgia	0	0	1	9,09
Diarréia	1	9,09	2	18,18
Dor abdominal	0	0	6	54,54
SUA	0	0	3	27,27
Boca seca	1	9,09	0	0
Lombalgia	0	0	1	9,09
Cefaléia	0	0	3	27,27
Taquicardia	0	0	1	9,09

SUA: Sangramento Uterino Anormal

### 4.3 Efeitos pós-medicação

#### 4.3.1 Sintomas clínicos

A análise comparativa demonstrou que houve redução nas queixas de dismenorréia, dispareunia e disquezia após 90 dias da administração da medicação sem, no entanto, alcançar significância estatística ( $p > 0,05$ ). Foi observado aumento não significativo nas queixas de dor acíclica e disúria, nesta primeira etapa de avaliação.

Na análise das queixas clínicas após 120 dias da infusão da medicação, houve diminuição na intensidade das queixas de dismenorréia, dispareunia, dor pélvica acíclica, disquezia e disúria, com significância estatística para o parâmetro de dispareunia ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8 -  $p_2$ ).

Na avaliação após 180 dias da medicação, houve redução estatisticamente significativa das queixas de dispareunia ( $p < 0,001$ ) e de disquezia ( $p = 0,008$ ). Também houve redução da queixa de dismenorréia, dor acíclica e disúria sem, no entanto, determinar significância estatística.

Para a avaliação global, considerando todo o período, tivemos redução estatisticamente significativa para as queixas de dispareunia ( $p < 0,001$ ), dor acíclica ( $p = 0,008$ ) e disquezia ( $p = 0,025$ ), conforme demonstrado na Tabela 8. Para a queixa de dor pélvica acíclica, a redução ocorreu no intervalo entre 90 e 180 dias ( $p = 0,012$ ).

**Tabela 8** – Sintomas clínicos avaliados de acordo com a escala visual analógica de dor (EVA) antes e após 90, 120 e 180 dias da medicação, expressos em média  $\pm$  desvio padrão

	<i>n</i>	Pré-medicação	90 dias	120 dias	180 dias	<i>p</i> 0	<i>p</i> 1	<i>p</i> 2	<i>p</i> 3
Dismenorréia	11	6,73 $\pm$ 3,9	5,09 $\pm$ 4,21	4,27 $\pm$ 3,93	4,64 $\pm$ 4,03	0,063	---	---	---
Dispareunia**	11***	7,82 $\pm$ 1,99	7,13 $\pm$ 3,23	6,25 $\pm$ 2,92	4,78 $\pm$ 3,15	<b>&lt;0,001</b>	0,174	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Dor Acíclica****	11	4,55 $\pm$ 3,53	4,73 $\pm$ 2,41	2,91 $\pm$ 2,88	3,18 $\pm$ 2,68	<b>0,008</b>	0,727	0,051	0,132
Disquezia*****	11	5,18 $\pm$ 4,26	4,73 $\pm$ 3,95	3,55 $\pm$ 3,75	1,64 $\pm$ 3,23	<b>0,025</b>	0,082	0,113	<b>0,008</b>
Disúria	11	0,45 $\pm$ 1,51	0,82 $\pm$ 1,83	0	0	0,075	---	---	---

\* EVA: Escala Visual Analógica.

\*\* Valor-p significativo também para os intervalos entre 90 e 120 dias ( $p < 0,001$ ), e entre 90 e 180 dias ( $p = 0,005$ ).

\*\*\* Para a queixa de dispareunia, tivemos um *n* inicial de 11 pacientes (pré-medicação), com *n* posteriores de 8 (90 e 120 dias), e de 9 (180 dias), pois foram consideradas na análise somente as pacientes com atividade sexual no momento da avaliação.

\*\*\*\* Valor-p significativo para o intervalo entre 90 e 180 dias ( $p = 0,012$ ).

\*\*\*\*\* Valor-p significativo também para os intervalos entre 90 e 180 dias ( $p = 0,012$ ) e entre 120 e 180 dias ( $p = 0,015$ ).

*p*0 = Valor-p global, considerando todo o período de avaliação (modelo linear misto);

*p*1 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 90 dias (modelo linear misto);

*p*2 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 120 dias (modelo linear misto);

*p*3 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 180 dias (modelo linear misto).

### 4.3.2 Exame Físico

Não foi observada alteração relevante no exame físico das pacientes após 180 dias da medicação, em comparação ao exame realizado pré-medicação. Os dados estão resumidos na Tabela 9.

**Tabela 9** – Exame físico das pacientes antes (A) e depois (D) de 180 dias da medicação

	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
<b>ABDOME</b>																						
Dor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	S	N	N	N	N	N
Massa Palpável	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>ESPECULAR</b>																						
Lesão de endometriose	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>TOQUE VAGINAL</b>																						
Mobilidade reduzida	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	S	N	S	S	N	N	N	N	N	N
Dor à mobilização cervical	N	N	S	N	S	S	S	S	N	N	S	N	S	N	S	S	N	N	N	N	S	S
Dor à mobilização uterina	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	A	A	N	N	N
Dor/ Nódulo/ Espessamento	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fundo de Saco Posterior			S		S																	S
Retrocervical							S	S	S	S			S	S	S	S	S	S				
Paracervical	S	S		S			S				S	S			S	S			S	S		
Ligamentos Uterossacos			S		S	S			S		S						S	S	S	S		S
Septo Retovaginal																						
Bexiga Parede Posterior																						
Massa anexial palpável	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

A – Antes da medicação; D – Depois de 180 dias da medicação  
 N - Não (ausência de alteração); S – Sim (presença de alteração)

### 4.3.3 Avaliação laboratorial

A média dos valores de FSH entre as pacientes foi de 4,45 mIU/mL antes da medicação, 4,86 mIU/mL após 90 dias e 7,29 mIU/mL após 180 dias. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para este parâmetro, bem como para os valores de hormônio anti-mülleriano (AMH), LH, prolactina e T4 livre. O valor de TSH exibiu aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) (Tabela 10).

Foi encontrado aumento, com significância estatística, para os valores de AST e ALT após 90 e 180 dias da infusão da medicação. O valor de fosfatase alcalina apresentou aumento sem significância estatística e a bilirrubina direta apresentou diminuição significativa na avaliação de todo o período de estudo. Bilirrubina indireta e albumina não apresentaram diferença significativa. A função

renal das pacientes, avaliada por meio da dosagem sérica de uréia e creatinina, não demonstrou diferença significativa com os valores basais pré-medicação (Tabela 10).

Os valores de hemoglobina (Hb), leucócitos e plaquetas exibiram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,018$ ,  $p = 0,006$ , respectivamente), porém dentro dos parâmetros de normalidade, conforme tabela abaixo.

**Tabela 10** – Comparativo de exames laboratoriais antes da medicação, após 90 e após 180 dias

	Pré-medicação	90 dias	180 dias	$p0$	$p1$	$p2$
Hemoglobina	13,32 ± 0,88 (n=11)	14,21 ± 0,65 (n=9)	14,22 ± 1,64 (n=10)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Leucócitos	7388,2 ± 1800,5 (n=11)	7822,2 ± 1290,4 (n=9)	9949,0 ± 4046,2 (n=10)	<b>0,018</b>	<b>0,003</b>	<b>0,020</b>
Plaquetas	276000 ± 40917 (n=11)	243556 ± 32082 (n=9)	259800 ± 38224 (n=10)	<b>0,006</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>
FSH	4,45 ± 2,32 (n=11)	4,86 ± 2,23 (n=9)	7,29 ± 7,06 (n=10)	0,216	---	---
LH	2,70 ± 2,50 (n=11)	2,71 ± 2,11 (n=9)	3,15 ± 3,55 (n=10)	0,773	---	---
AMH	0,87 ± 1,32 (n=11)	---	0,69 ± 1,20 (n=11)	0,208	---	---
TSH	1,52 ± 0,70 (n=11)	2,35 ± 1,66 (n=9)	2,79 ± 2,21 (n=10)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,016</b>	<b>&lt;0,001</b>
T4 livre	1,01 ± 0,08 (n=11)	1,00 ± 0,08 (n=9)	1,04 ± 0,07 (n=10)	0,429	---	---
Prolactina	10,33 ± 3,76 (n=11)	12,16 ± 5,59 (n=9)	11,30 ± 5,79 (n=10)	0,266	---	---
BD	0,12 ± 0,04 (n=11)	0,12 ± 0,03 (n=9)	0,11 ± 0,08 (n=10)	<b>0,022</b>	0,991	<b>0,021</b>
BI	0,47 ± 0,15 (n=11)	0,49 ± 0,20 (n=9)	0,49 ± 0,29 (n=10)	0,683	---	---
AST	15,64 ± 5,45 (n=11)	23,22 ± 7,29 (n=9)	22,60 ± 6,87 (n=10)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
ALT	13,18 ± 9,80 (n=11)	17,44 ± 11,10 (n=9)	19,80 ± 13,54 (n=10)	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,011</b>
FALC	63,18 ± 16,23 (n=11)	72,11 ± 17,51 (n=9)	72,00 ± 16,03 (n=10)	0,053	---	---
Albumina	4,15 ± 0,30 (n=11)	4,41 ± 0,39 (n=9)	4,19 ± 0,26 (n=10)	0,463	---	---
Uréia	22,45 ± 4,18	25,11 ± 4,79	24,02 ± 6,25	0,194	---	---
Creatinina	0,78 ± 0,11	0,74 ± 0,07	0,77 ± 0,10	0,173	---	---

FSH: Hormônio Folículo Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; AMH: Hormônio Anti-mulleriano; TSH: Hormônio Tireoestimulante; BD: Bilirrubina Direta; BI: Bilirrubina Indireta; AST: Aspartato Aminotransferase; ALT: Alanina Aminotransferase; FALC: Fosfatase Alcalina.

$p0$  = Valor-p global, considerando todo o período de avaliação (modelo linear misto);

$p1$  = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 90 dias (modelo linear misto);

$p2$  = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 180 dias (modelo linear misto).

#### 4.3.4 Avaliação Ultrassonográfica

Não houve redução significativa do tamanho das lesões intestinais em nenhuma das medidas (longitudinal, ântero-posterior e transversal) avaliadas na ultrassonografia. Em relação à lesão em manto posterior e aos endometriomas ovarianos, também não houve variação estatisticamente significativa (Tabela

11). Uma paciente não realizou o exame de ultrassom no intervalo de 30 dias, mesmo após várias tentativas de contato e insistência na realização do mesmo.

**Tabela 11** – Média das medidas das lesões de endometriose ao ultrassom transvaginal antes da medicação, após 30 dias e após 180 dias

	Pré-medicação	30 dias	180 dias	<i>p</i> 0	<i>p</i> 1	<i>p</i> 2
<b>Lesão Intestinal</b>						
Longitudinal (cm)	4,77 ± 2,43 (n=11)	5,03 ± 2,55 (n=10)	4,81 ± 2,41 (n=11)	0,751	---	---
Ântero-posterior (cm)	0,85 ± 0,16 (n=11)	0,88 ± 0,18 (n=10)	0,86 ± 0,20 (n=11)	0,936	---	---
Transversal (cm)	1,76 ± 0,41 (n=11)	1,67 ± 0,39 (n=10)	1,66 ± 0,31 (n=11)	0,191	---	---
Circunferência (%)	35,45 ± 8,20 (n=11)	33,6 ± 7,88 (n=10)	33,73 ± 5,41 (n=11)	0,190	---	---
<b>Manto posterior</b>						
Profundidade (cm)	0,76 ± 0,13 (n=10)	0,84 ± 0,27 (n=9)	0,83 ± 0,27 (n=10)	0,338	---	---
<b>Endometrioma</b>						
Endometrioma (cm)	3,0 ± 1,75 (n=5)	4,5 ± 0 (n=2)	3,25 ± 1,67 (n=4)	0,559	---	---

*p*0 = Valor-p global, considerando todo o período de avaliação (modelo linear misto);

*p*1 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 30 dias (modelo linear misto);

*p*2 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 180 dias (modelo linear misto);

#### 4.3.5 Análise comparativa longitudinal entre doses e tempos

As tabelas a seguir apresentam as comparações das variáveis numéricas entre as pacientes que fizeram uma dose e duas doses da medicação, em relação aos parâmetros analisados.

Podemos observar que, para as queixas de dismenorréia, dispareunia, dor acíclica, disquezia e disúria não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas doses da medicação, mas, ao longo do tempo, houve diferença significativa para as queixas de dispareunia, dor acíclica e disquezia. Para a queixa de disquezia, o valor global de *p*, que é significativo, se atribui à realização de duas doses da medicação (Tabela 12). A interpretação deve, no entanto, ser cautelosa, devido à diferença observada entre o número de pacientes que realizaram uma dose (n=3) e duas doses (n=8).



**Tabela 12** – Comparação de sintomas clínicos avaliados pela escala visual analógica de dor (EVA) entre uma dose e duas doses de medicação, ao longo do tempo

	Pré- medicação	90 dias	120 dias	180 dias	<i>p</i> 0	<i>p</i> 1	<i>p</i> 2	<i>p</i> 3	<i>p</i> 4	<i>p</i> 5	<i>p</i> 6	<i>p</i> 7
<b>Dismenorréia</b>					0,129	0,063						
1 dose	8,33 ± 1,53	8,33 ± 1,53	3,67 ± 4,04	4,33 ± 3,79			---	---	---	---	---	---
2 doses	6,13 ± 4,42	3,88 ± 4,29	4,50 ± 4,14	4,75 ± 4,37			---	---	---	---	---	---
<b>Dispareunia</b>					0,208	0,002						
1 dose	7,33 ± 1,15	5,33 ± 4,62	4,67 ± 4,16	4,33 ± 4,04			0,221	0,016	0,015	0,221	0,221	0,221
2 doses	8,00 ± 2,27	8,20 ± 1,92	7,20 ± 1,79	5,00 ± 3,03			0,544	<0,001	0,002	<0,001	0,004	0,071
<b>Dor Acíclica</b>					0,114	0,008						
1 dose	6,33 ± 2,08	6,33 ± 1,53	4,00 ± 3,61	5,00 ± 1,73			0,804	0,018	0,221	0,255	0,273	0,758
2 doses	3,88 ± 3,83	4,13 ± 2,47	2,50 ± 2,73	2,50 ± 2,73			0,789	0,209	0,278	0,133	0,006	1,000
<b>Disquezia</b>					0,870	0,025						
1 dose	5,67 ± 5,13	6,00 ± 5,29	4,67 ± 5,03	3,33 ± 5,77			0,221	0,221	0,221	0,221	0,221	0,221
2 doses	5,00 ± 4,28	4,25 ± 3,65	3,13 ± 3,48	1,00 ± 1,93			0,003	0,167	0,017	0,390	0,029	0,033
<b>Disúria</b>					0,083	0,080						
1 dose	1,67 ± 2,89	1,33 ± 2,31	0	0			---	---	---	---	---	---
2 doses	0	0,63 ± 1,77	0	0			---	---	---	---	---	---

\* EVA: Escala Visual Analógica.

*p*0 = Valor-p para a diferença de resultados atribuída à dose da medicação (1 ou duas doses) - modelo linear misto;

*p*1 = Valor-p global, considerando avaliações ao longo do tempo (modelo linear misto);

*p*2 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 90 dias (modelo linear misto);

*p*3 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 120 dias (modelo linear misto);

*p*4 = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 180 dias (modelo linear misto);

*p*5 = Valor-p comparando os valores de avaliação entre 90 e 120 dias (modelo linear misto);

*p*6 = Valor-p comparando os valores de avaliação entre 90 e 180 dias (modelo linear misto);

*p*7 = Valor-p comparando os valores de avaliação entre 120 e 180 dias (modelo linear misto).

Na avaliação das lesões de endometriose profunda visualizadas ao ultrassom, não houve diferença significativa entre a realização de uma ou duas doses da medicação, conforme expresso na Tabela 13, e nem ao longo do tempo.

**Tabela 13** - Comparação das lesões de endometriose ao ultrassom, entre uma dose e duas doses de medicação, ao longo do tempo

	Pré-medicação	30 dias	180 dias	<i>p0</i>	<i>p1</i>
<b>Lesão Intestinal</b>					
Longitudinal (cm)				0,482	0,751
dose 1	4,03 ± 1,29	4,75 ± 1,77	4,27 ± 1,50		
dose 2	5,05 ± 2,77	5,10 ± 2,81	5,01 ± 2,73		
Ântero-posterior (cm)				0,414	0,936
dose 1	0,80 ± 0,17	0,80 ± 0,28	0,77 ± 0,21		
dose 2	0,88 ± 0,16	0,90 ± 0,17	0,90 ± 0,19		
Transversal (cm)				0,311	0,191
dose 1	1,70 ± 0,26	1,70 ± 0,42	1,63 ± 0,35		
dose 2	1,79 ± 0,46	1,66 ± 0,41	1,68 ± 0,32		
Circunferência (%)				0,545	0,190
dose 1	34,67 ± 6,11	34,00 ± 8,49	33,33 ± 6,11		
dose 2	35,75 ± 9,22	33,50 ± 8,33	33,88 ± 5,57		
<b>Manto posterior</b>					
Profundidade (cm)				0,484	0,338
dose 1	0,80 ± 0,17	0,70 ± 0,28	0,67 ± 0,21		
dose 2	0,74 ± 0,11	0,89 ± 0,27	0,90 ± 0,28		
<b>Endometrioma</b>					
Endometrioma (cm)				0,407	0,541
dose 1	3,75	---	2,45		
dose 2	2,81 ± 1,96	4,50 ± 0	3,52 ± 1,94		

*p0* = Valor-p para a diferença de resultados atribuída à dose da medicação (uma ou duas doses) - modelo linear misto;  
*p1* = Valor-p global, considerando avaliações ao longo do tempo (modelo linear misto);

Em relação aos exames laboratoriais não encontramos diferença significativa na análise comparativa entre doses (Tabela 14).

**Tabela 14 – Comparação entre os resultados de exames laboratoriais ao longo do tempo, entre uma dose e duas doses da medicação (continua)**

	Pré-medicação	90 dias	180 dias	p0	p1	p2	p3	p4
<b>Hemoglobina</b>				0,912	<0,001			
dose 1	13,30 ± 1,01	14,10 ± 0,00	14,60 ± 0,28			0,123	<0,001	0,004
dose 2	13,33 ± 0,90	14,24 ± 0,74	14,13 ± 1,26			<0,001	<0,001	0,590
<b>Leucócitos</b>				0,732	0,014			
dose 1	7960 ± 3394,8	7075 ± 2043,5	9660 ± 1060,7			0,960	0,199	0,102
dose 2	7173,8 ± 1070,3	8035,7 ± 1133,6	10021,3 ± 4567,2			<0,001	0,026	0,547
<b>Plaquetas</b>				0,415	0,006			
dose 1	282667 ± 70692	207000 ± 4242,6	257500 ± 85560			0,005	0,153	0,302
dose 2	273500 ± 30622	254000 ± 28225	260375 ± 28824			0,096	0,020	0,531
<b>FSH</b>				0,115	0,206			
dose 1	6,66 ± 1,45	4,41 ± 2,28	6,04 ± 1,98			---	---	---
dose 2	3,62 ± 2,05	4,99 ± 2,39	7,60 ± 7,93			---	---	---
<b>LH</b>				0,545	0,736			
dose 1	4,83 ± 3,88	3,98 ± 4,77	1,93 ± 1,73			---	---	---
dose 2	1,90 ± 1,39	2,34 ± 1,20	3,46 ± 3,90			---	---	---
<b>HAM</b>				0,754	0,208			
dose 1	1,55 ± 2,50	---	1,42 ± 2,33			---	---	---
dose 2	0,62 ± 0,67	---	0,42 ± 0,46			---	---	---
<b>TSH</b>				0,101	<0,001			
dose 1	1,22 ± 0,77	1,53 ± 1,05	0,86 ± 0,13			<0,001	0,996	0,025
dose 2	1,63 ± 0,69	2,59 ± 1,78	3,27 ± 2,23			0,040	<0,001	0,089
<b>T4 livre</b>				0,054	0,396			
dose 1	1,03 ± 0,02	1,11 ± 0,05	1,00 ± 0,01			---	---	---
dose 2	1,00 ± 0,09	0,97 ± 0,05	1,05 ± 0,07			---	---	---
<b>Prolactina</b>				0,673	0,278			
dose 1	10,00 ± 6,24	16,35 ± 12,52	5,85 ± 1,91			---	---	---
dose 2	10,45 ± 3,01	10,96 ± 2,84	12,66 ± 5,65			---	---	---
<b>BD</b>				0,209	0,024			
dose 1	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,22 ± 0,18			0,350	0,576	0,848
dose 2	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,02			0,670	<0,001	<0,001
<b>BI</b>				0,567	0,696			
dose 1	0,48 ± 0,11	0,67 ± 0,11	0,42 ± 0,56			---	---	---
dose 2	0,47 ± 0,16	0,44 ± 0,19	0,51 ± 0,25			---	---	---
<b>AST</b>				0,127	<0,001			
dose 1	13,67 ± 2,31	19,50 ± 0,71	20,50 ± 0,71			<0,001	<0,001	<0,001
dose 2	16,38 ± 6,21	24,29 ± 8,06	23,13 ± 7,68			<0,001	<0,001	0,142

**Tabela 14 – Comparação entre os resultados de exames laboratoriais ao longo do tempo, entre uma dose e duas doses da medicação (final)**

	Pré-medicação	90 dias	180 dias	<i>p0</i>	<i>p1</i>	<i>p2</i>	<i>p3</i>	<i>p4</i>
<b>ALT</b>				0,501	0,009			
dose 1	13,67 ± 5,86	16,00 ± 5,66	18,50 ± 10,61			0,355	0,655	0,909
dose 2	13,00 ± 11,28	17,86 ± 12,58	20,13 ± 14,80			<0,001	<0,001	0,666
<b>FALC</b>				0,919	0,051			
dose 1	65,00 ± 21,93	61,00 ± 31,11	80,00 ± 1,41			---	---	---
dose 2	62,50 ± 15,40	75,29 ± 13,95	70,00 ± 17,53			---	---	---
<b>Albumina</b>				0,784	0,471			
dose 1	4,20 ± 0,17	4,50 ± 0,28	4,15 ± 0,21			---	---	---
dose 2	4,14 ± 0,34	4,39 ± 0,43	4,20 ± 0,28			---	---	---
<b>Uréia</b>				0,391	0,191			
dose 1	23,33 ± 2,52	26,95 ± 1,91	23,80 ± 1,56			---	---	---
dose 2	22,13 ± 4,76	24,59 ± 5,34	24,08 ± 7,06			---	---	---
<b>Creatinina</b>				0,948	0,172			
dose 1	0,81 ± 0,10	0,75 ± 0,07	0,75 ± 0,07			---	---	---
dose 2	0,77 ± 0,12	0,74 ± 0,08	0,77 ± 0,11			---	---	---

*p0* = Valor-p para a diferença de resultados atribuída à dose da medicação (uma ou duas doses);

*p1* = Valor-p global, considerando avaliações ao longo do tempo (modelo linear misto);

*p2* = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 90 dias (modelo linear misto);

*p3* = Valor-p comparando os valores de avaliação pré e após 180 dias (modelo linear misto);

*p4* = Valor-p comparando os valores de avaliação entre 90 e 180 dias (modelo linear misto);

As diferenças estatisticamente significativas ocorreram ao longo do tempo para hemoglobina (aumento significativo entre pré e 180 dias, e entre 90 e 180 dias para a dose 1; aumento entre pré e 90 dias, e entre pré e 180 dias para a dose 2), leucócitos (aumento entre pré e 90 dias, e entre pré e 180 dias para a dose 2), e plaquetas (aumento entre pré e 90 dias para dose 1; aumento entre pré e 180 dias para a dose 2). FSH, LH, prolactina e hormônio anti-mülleriano não apresentaram diferenças entre doses e nem ao longo do tempo. TSH apresentou aumento significativo ao longo do tempo, sendo esse aumento significativo para os intervalos entre pré e 90 dias, e entre 90 e 180 dias para a dose 1, e entre pré e 90 dias e entre pré e 180 dias para a dose 2. Não houve diferença entre doses. T4 livre não apresentou diferença entre doses e nem ao longo do tempo (Tabela 14).

Entre os parâmetros de avaliação de toxicidade hepática e renal, encontramos diferença significativa ao longo do tempo para bilirrubina direta

(diminuição para a dose 2 nos intervalos entre pré e 180 dias, e entre 90 e 180 dias), AST (aumento para a dose 1 nos intervalos entre pré e 90 dias, pré e 180 dias e entre 90 e 180 dias; para a dose 2, aumento entre pré e 90 dias, e entre pré e 180 dias) e ALT (aumento para a dose 2 entre pré e 90 dias, e entre pré e 180 dias). Os valores de bilirrubina indireta, fosfatase alcalina, albumina, uréia e creatinina não apresentaram aumento significativo entre doses e nem ao longo do tempo, nos intervalos pesquisados (Tabela 14).

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar a eficácia do tratamento da dor pélvica em pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal com o uso de droga antiproliferativa (metotrexato) acoplado à nanoemulsão lipídica (LDE). Trata-se do primeiro ensaio clínico em humanos com o uso desse tipo de tratamento para mulheres com endometriose profunda intestinal.

Nosso grupo desenvolveu estudos anteriores que pavimentaram o caminho para a presente pesquisa ao demonstrarem maior expressão gênica de receptores de colesterol LDL (LDL-R e LRP-1) na membrana celular de focos de endometriose profunda intestinal (Gibran *et al.*, 2017) e absorção do LDE marcado com carbono 14 em lesões de endometriose profunda (Bedin *et al.*, 2019). Essas observações sinalizaram para o uso da via de endocitose mediada por LDL como um mecanismo para o tratamento da endometriose por meio de uma terapia sítio específica. Os resultados obtidos com este estudo mostraram a segurança do tratamento com o metotrexato e sugerem que o LDE-MTX pode ser promissor no tratamento de mulheres com endometriose profunda intestinal, pois obtivemos melhora estatisticamente significativa nas queixas de dispareunia, dor pélvica acíclica e disquezia no intervalo de tempo analisado.

### 5.1 Toxicidade

Um estudo de coorte retrospectivo buscou avaliar características clínicas e fatores de risco identificáveis para o desenvolvimento de toxicidade relacionada ao uso de baixas doses de metotrexato, e sugeriu a insuficiência renal, a hipoalbuminemia, o uso de inibidores da bomba de prótons e o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais como fatores de risco para este desfecho (Kivity *et al.*, 2014). Como baixa dose, se entende 5 a 25 mg/semana; alta dose é considerada até 1 grama por ciclo e é prescrita no tratamento de câncer, como leucemia linfóide aguda em crianças, câncer de bexiga, neoplasias trofoblásticas

e osteossarcomas. Náuseas, vômitos, cefaleia, fadiga, diarreia, mielossupressão, pancitopenia, disfunção hepática e renal, mucosite, estomatite, úlceras gastrointestinais e cutâneas, queda de cabelo, sintomas pulmonares e pneumonites são manifestações de toxicidade descritas para o uso do metotrexato, ainda que em baixas doses (Kivity *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018; Bedoui *et al.*, 2020; Katturajan *et al.*, 2021).

No presente estudo, tivemos efeitos colaterais de leve intensidade em 45,46% das mulheres nas primeiras 6 horas após a infusão e em 90,91% das mulheres até o quinto dia após a medicação. Nenhuma paciente apresentou evento adverso grave. Os principais sintomas relatados após a infusão foram moleza, tontura, náusea, diarreia e sensação de boca seca. Até o quinto dia, sete das onze pacientes se queixaram de náuseas, seis se queixaram de dor abdominal, quatro de moleza, três de sangramento uterino anormal e três de cefaleia. Os efeitos colaterais foram leves e não necessitaram de atendimento médico, sendo resolvidos espontaneamente ou com o uso de sintomáticos habituais. No presente estudo, portanto, para a dose utilizada ( $25\text{mg}/\text{m}^2$ ), a medicação apresentou baixo perfil de toxicidade.

## 5.2 Avaliação Laboratorial

Em relação aos exames laboratoriais, encontramos variação nos parâmetros de hemoglobina (Hb), leucócitos, plaquetas, hormônio tireoestimulante (TSH), bilirrubina direta (BD), aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT). Houve aumento nos valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas, fato que provavelmente não se correlaciona à intervenção realizada na pesquisa, uma vez que o esperado, dentro do perfil de toxicidade da droga, seria diminuição dos valores sinalizando para uma possível injúria medular (Bedoui *et al.*, 2020; Katturajan *et al.*, 2021). A toxicidade hematológica é encontrada em cerca de 25% dos pacientes em tratamento de artrite reumatoide (Wang *et al.*, 2018). O valor de TSH exibiu aumento significativo para os intervalos entre pré e 90 dias, e entre pré e 180 dias, sendo que os valores de T4 livre não sofreram alteração significativa. AST e ALT exibiram aumento estatisticamente significativo, mas não clinicamente

significativo, uma vez que se mantiveram dentro dos parâmetros normais. A literatura nos mostra que elevações discretas nas aminotransferases são relativamente comuns (69-88%) para os usos habituais da droga, especialmente nos primeiros quatro anos (Salliot & van der Heijde, 2009; Bedoui *et al.*, 2020; Hannoodee & Mital, 2021), só havendo indicação de interrupção quando esses valores são maiores que duas vezes o limite superior da normalidade (Saag *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016). A bilirrubina direta apresentou diminuição da média nos intervalos analisados, inferindo normalidade. Albumina, que reflete funcionamento hepático por ser este órgão responsável pela sua produção, manteve-se sem alterações significativas, sendo observado até discreto aumento.

Insuficiência renal aguda pode ocorrer em 2 a 12% dos pacientes que recebem altas doses de MTX, definidas como doses iguais ou superiores a 500 mg/m<sup>2</sup>, atribuída à cristalização da droga no lumen dos túbulos renais (Howard *et al.*, 2016). Os valores de uréia e creatinina mantiveram-se sem alterações significativas neste estudo. A partir desses dados, podemos concluir que o metotrexato é seguro para ser utilizado na dose realizada, acoplado à nanoemulsão lipídica.

Não houve mudança significativa nos valores de hormônio anti-mülleriano e nem dos valores de FSH e LH ao longo do estudo, resultado em consonância com estudos anteriores (Oriol *et al.*, 2008; Ohannessian *et al.*, 2014; Boots *et al.*, 2016; Sahin *et al.*, 2016; Sahin Ersoy *et al.*, 2016; Shirazi *et al.*, 2020) que demonstraram não haver impacto no futuro reprodutivo com o uso da droga. A prolactina não é um parâmetro de toxicidade comumente avaliado, mas em estudo com pacientes com câncer de mama, submetidas à quimioterapia com o protocolo de ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF) foi detectado aumento em duas de 10 pacientes avaliadas, sem, no entanto, haver explicação para este efeito (Kailajärvi *et al.*, 2000). Este mesmo estudo não encontrou alterações significativas nos valores de TSH das pacientes que receberam a medicação, com diminuição discreta nos parâmetros de T4 livre e T3 livre (Kailajärvi *et al.*, 2000). De apresentação bastante rara, as desordens



linfoproliferativas associadas ao metotrexato poderiam cursar com hipopituitarismo (Aoshima *et al.*, 2019).

### 5.3 Avaliação Clínica

A literatura nos mostra que não há uma relação direta entre extensão da endometriose e a intensidade da queixa algica apresentada pela paciente: nódulos pequenos podem causar sintomas severos, e pacientes assintomáticas podem apresentar acometimento pélvico extenso (Fauconnier *et al.*, 2002; Abrao *et al.*, 2021). No entanto, quando consideramos as diferentes formas de apresentação da doença, conforme sugerido por Nisolle e Donnez, em 1997, temos que a endometriose profunda infiltrativa é a única forma da doença cuja relação com a queixa de dor pélvica crônica é mais estabelecida (Fauconnier & Chapron, 2005), e um dos mecanismos descritos é a compressão ou infiltração das fibras nervosas subperitoneais adjacentes (Fauconnier & Chapron, 2005). Existem ainda características distintas do nódulo de endometriose profunda em relação à endometriose peritoneal superficial: além dos componentes glandular e estromal, e do componente de fibrose secundário à inflamação (devido às micro-hemorragias recorrentes pela atividade metabólica do endométrio ectópico), existe ainda a presença de fibras musculares lisas (Cornillie *et al.*, 1990; Anaf *et al.*, 2000; Vercellini *et al.*, 2017; Vercellini *et al.*, 2018; Viganò *et al.*, 2018). Em resumo, a lesão profunda se apresenta em formato de nódulos ou placas, constituída por fibrose e músculo liso, além do componente glandular e estromal semelhante ao endométrio tópico (Anaf *et al.*, 2000).

A dor, nessas pacientes, poderia ocorrer por dois mecanismos: a liberação recorrente de mediadores inflamatórios, como citocinas e prostaglandinas causam uma dor de comportamento funcional, geralmente cíclica, como os sintomas intestinais irritativos. Já a retração do tecido fibrótico seria responsável pelos sintomas intestinais obstrutivos, apesar de os nódulos da parede intestinal também sofrerem influência dos processos inflamatórios (Vercellini *et al.*, 2018). Outras publicações sobre o tema destacaram, além do mecanismo inflamatório, (Howard, 2009; Nothnick & Alali, 2016, Brichant *et al.*,

2022), os mecanismos nociceptivo e neuropático, este último por lesão direta da fibra nervosa e sensibilização central (Howard, 2009).

Para o uso do metotrexato acoplado à nanoemulsão lipídica (LDE-MTX) tivemos apenas estudos prévios em animais: o tratamento de artrite induzida em coelhos mostrou vantagem da ação anti-inflamatória da droga em relação à preparação comercial (Mello *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2016). Em modelos de transplante cardíaco em coelhos, o LDE-MTX teve papel significativo na expressão gênica de fatores pró-inflamatórios, reduzindo vinte vezes a expressão dos genes de TNF- $\alpha$  e MCP-1, e quinze vezes para a interleucina 18 (Fiorelli *et al.*, 2017). Para a expressão gênica de VCAM-1 (Molécula de adesão celular vascular -1), a redução foi de trinta vezes (Fiorelli *et al.*, 2017). Mostrou também aumento na expressão de IL-10, de ação anti-inflamatória (Fiorelli *et al.*, 2017). Estudos anteriores demonstraram que as pacientes com endometriose apresentam aumento de mediadores inflamatórios, como o próprio TNF- $\alpha$ , MIF, MCP-1, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), prostaglandinas, entre outros (Podgaec *et al.*, 2007; Nothnick & Alali, 2016; Riccio *et al.*, 2018; Bellelis *et al.*, 2019; Li & LibinWeng, 2022, Brichant *et al.*, 2022).

Nas pacientes com endometriose, objetivamos alcançar com o uso do metotrexato e sua conhecida ação anti-inflamatória (Wessels *et al.*, 2008; Abolmaali *et al.*, 2013), o controle da inflamação, que é a principal fonte de dor na doença (Howard, 2009; Nothnick & Alali, 2016; Brichant *et al.*, 2022). O controle de alguns mediadores inflamatórios que se encontram elevados, com o uso da medicação, pode ser responsável pelo resultado observado neste projeto: a melhora clínica da dor, sem a melhora correspondente no exame de imagem. A maior atividade proliferativa da doença, demonstrada em estudo anterior com cultura de células de implantes de endometriose profunda e ovariana, em comparação com tecidos normais, (Ngô *et al.*, 2010) também pode ter sofrido impacto pelo uso da medicação, apesar de ser esta uma hipótese que não tenha encontrado subsídios com a adição da medicação nessas culturas de células (Ngô *et al.*, 2010). No entanto, a melhor biodisponibilidade da droga esperada com o uso da nanoemulsão lipídica, a qual promoveria uma entrada facilitada da medicação dentro da célula, poderia resultar em maior efetividade, uma vez que

venceria alguns dos mecanismos descritos para resistência no uso da droga, relacionados à entrada na célula via receptor e à capacidade de difusão entre membranas celulares (Huennekens *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 2011).

A melhora clínica observada neste estudo, para as queixas de dispareunia, dor acíclica e disquezia pode ter ocorrido, portanto, pela ação anti-inflamatória da droga. O exame físico não exibiu alterações proeminentes na análise subjetiva do examinador único (R.A-T.), mas esta modalidade de avaliação apresenta menor acurácia que os exames de imagem existentes para diagnóstico e seguimento da doença (Hudelist *et al.*, 2011a; Chapron *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2020).

#### **5.4 Avaliação Ultrassonográfica**

A avaliação por ultrassom das pacientes foi realizada em três oportunidades distintas: antes da medicação, após 30 dias da realização da mesma, e ao final do seguimento, com 180 dias da administração da medicação. Acreditamos que o ultrassom pélvico e transvaginal com preparo intestinal seja a melhor ferramenta para a avaliação de endometriose profunda e intestinal e a literatura corrobora essa afirmação (Abrao *et al.*, 2007; Goncalves *et al.*, 2010; Hudelist *et al.*, 2011b; Exacoustos *et al.*, 2014; Indrielle-Kelly *et al.*, 2020). Todos os exames foram realizados por um único profissional (M.O.G.), muito experiente neste tipo de avaliação, dirimindo possíveis diferenças interobservador na avaliação do compartimento posterior (Bean *et al.*, 2020).

Não há consenso sobre o melhor método para avaliar a progressão ou redução da lesão intestinal através do exame de imagem e vários parâmetros já foram propostos: enquanto um estudo considerou o volume da lesão intestinal ao ultrassom (produto das medidas longitudinal, ântero-posterior e transversal do nódulo ao ultrassom, multiplicado pelo fator de correção 0,52) (Leonardo-Pinto *et al.*, 2017), outro estudo avaliou separadamente as medidas de comprimento e circunferência ao ultrassom, na avaliação e seguimento das pacientes com doença intestinal (Abrao *et al.*, 2021). Um estudo que avaliou nódulos de endometriose profunda em retossigmóide, através da ressonância magnética, utilizou como parâmetro para a progressão ou regressão destes

nódulos a diferença  $\geq 20\%$  nas medidas de comprimento ou de espessura; diferenças abaixo deste valor foram consideradas estabilidade do nódulo (Netter *et al.*, 2019). Este valor de cut-off foi definido a partir de critérios utilizados para definir o crescimento de tumores sólidos (Eisenhauer *et al.*, 2009).

Por não haver consenso sobre a melhor forma de avaliar progressão dos nódulos de endometriose intestinal, optamos por avaliar as lesões nas três medidas (longitudinal, ântero-posterior e transversal), e também a circunferência da alça acometida. Não optamos pela avaliação pelo volume pelo fato de o nódulo de endometriose ser bastante heterogêneo em seu formato. Não encontramos, conforme descrito, redução ou progressão das lesões, em nenhuma das medidas, com o uso do LDE-MTX no espaço de tempo avaliado (30 e 180 dias após medicação).

A ausência de redução na lesão intestinal, apesar da melhora clínica, também foi observada em outros estudos, que demonstraram a inexistência de redução significativa da lesão intestinal apesar da expressiva melhora na queixa de dor e da qualidade de vida após o tratamento com dienogeste (Leonardo-Pinto *et al.*, 2017). Ou seja, não há necessariamente relação entre a remissão das queixas algicas e a redução do volume dos nódulos de endometriose profunda (Leonardo-Pinto *et al.*, 2017; Egekvist *et al.*, 2019; Abrao *et al.*, 2021). O maior componente de fibrose presente nas lesões de endometriose profunda intestinal, em comparação com a endometriose profunda em outras localizações, pode ser o responsável pela menor resposta observada no tratamento clínico da doença nesta topografia, e também pela menor absorção de LDE marcada com carbono 14 observada em estudo anterior, em relação à pacientes sem comprometimento intestinal (Bedin *et al.*, 2019). Entender essa característica da lesão intestinal poderá resultar em tratamentos mais efetivos, levando em consideração esta particularidade (Vigano *et al.*, 2018).

## 5.5 Comparações entre doses

Conforme mencionado anteriormente, o metotrexato tem diversas aplicações na medicina, sendo considerado tratamento de primeira linha em diversas doenças reumatológicas, tendo como seu maior exemplo a artrite

reumatoide (Kremer *et al.*, 2004; Padjen *et al.*, 2020; Hannoodee & Mittal, 2021; Sherbini *et al.*, 2021). Em ginecologia, seu uso mais expressivo encontra-se no tratamento da gravidez ectópica, desde 1982, em suas diversas apresentações clínicas; no entanto, foi primeiramente utilizado para o tratamento do coriocarcinoma e da doença trofoblástica gestacional (ACOG, 2018; Revzin *et al.*, 2021).

Para o tratamento da gravidez ectópica, seu uso mais consagrado dentro da ginecologia, são recomendadas três opções de protocolo: o regime de dose única, de duas doses e de múltiplas doses. O primeiro consiste na administração de 50 mg/m<sup>2</sup> de MTX no dia 1, seguida da dosagem da beta-hcg nos dias 4 e 7. Se a dosagem sérica deste hormônio apresentar redução maior ou igual a 15%, é feito o seguimento semanal até negatificação. Se menor do que 15%, nova dose de MTX (50 mg/m<sup>2</sup>) é aplicada (ACOG, 2018). O regime de duas doses consiste na aplicação da mesma dose de MTX (50 mg/m<sup>2</sup>) nos dias 1 e 4, com dosagem de beta-hcg nos dias 4 e 7. Não havendo redução maior do que 15%, nova dosagem de 50 mg/m<sup>2</sup> será aplicada no dia 7 (ACOG, 2018). Para o regime de multidose, 1mg/kg de MTX é aplicado nos dias 1, 3 e 5, alternado com o uso de ácido fólico (0,1 mg/kg) nos dias 2, 4, 6 e 8 (ACOG, 2018).

Posteriormente ao uso no tratamento da doença trofoblástica e da gravidez ectópica, o metotrexato foi testado em endometriomas ovarianos, os quais receberam, após aspiração de seu conteúdo, 30 mg da droga diluídos em 3 ml de solução salina (Mesogitis *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2007; Shawki *et al.*, 2012).

A partir desses dados, optamos pela realização de no mínimo 50 mg/m<sup>2</sup> e no máximo 100 mg/m<sup>2</sup> de dose total da droga, à semelhança da dose utilizada no tratamento da gravidez ectópica. No presente estudo, como era esperado um melhor desempenho da droga acoplada à nanoemulsão lipídica, com melhora da citotoxicidade e como seu uso nesta apresentação em humanos era inédito, optamos por dividir a dose mínima (50 mg/m<sup>2</sup>) em duas tomadas de 25 mg/m<sup>2</sup>, e a dose máxima (100 mg/m<sup>2</sup>) em quatro tomadas de 25 mg/m<sup>2</sup>, com uma dose intermediária de 75 mg/m<sup>2</sup>, dividida em 3 tomadas de 25 mg/m<sup>2</sup>. Pelas restrições

impostas pela pandemia, conseguimos administrar nas pacientes participantes 25 ou 50 mg/m<sup>2</sup> de dose total.

Conforme apresentado nos resultados, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos parâmetros clínicos, laboratoriais e de imagem entre a realização de uma dose (total de 25 mg/m<sup>2</sup>) e duas doses (total de 50 mg/m<sup>2</sup>). Estes dados, no entanto, devem ser vistos com moderação devido ao tamanho reduzido do grupo que recebeu uma dose.

## 5.6 Nanotecnologia e Endometriose

O uso da nanotecnologia em medicina vem crescendo ao longo dos últimos anos, com o advento de nanossistemas para o diagnóstico e tratamento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, neurológicas e oculares, bem como doenças infecciosas (Anjum *et al.*, 2021; Chowdhury *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). Muito tem se desenvolvido, particularmente no campo das doenças neoplásicas, tanto como ferramenta auxiliar no diagnóstico, quanto para o tratamento deste grupo de doenças (Moses *et al.*, 2021; Sindhwani & Chan, 2021; Tang *et al.*, 2021). As nanopartículas, em medicina, podem variar de 5 a 250 nm (Anjum *et al.*, 2021). Como carreadoras de drogas em sistema de *delivery*, além de potencializar os efeitos citotóxicos, também protegem contra mecanismos degradativos da circulação sistêmica, como hidrólise e oxidação, aumentando sua permanência no plasma e, por conseguinte, permitindo que maior quantidade da substância em questão possa agir no tecido alvo (Moses *et al.*, 2021). A melhora da solubilidade também é uma vantagem descrita, bem como a fuga da resposta imunológica e mudanças na cinética de eliminação da droga, pela mudança no tamanho da mesma (Anjum *et al.*, 2021; Moses *et al.*, 2021; Sindhwani & Chan, 2021).

As nanopartículas podem ser de diversas naturezas e podem incorporar as drogas de diversas formas: encapsulados dentro das nanopartículas, integradas à matriz do material ou apresentadas na superfície, a depender da interação celular desejada (Anjum *et al.*, 2021; Sindhwani & Chan, 2021). O resultado é uma medicação nova, com características como tamanho, forma e química de superfície diferentes da original (Sindhwani & Chan, 2021). As nanopartículas

lipídicas, em especial, são as que contêm frações de natureza lipídica, tem diâmetro que varia de 10 a 100 nm, são esféricas em sua forma, possuem núcleo lipídico sólido e podem transportar moléculas lipofílicas com facilidade (Anjum *et al.*, 2021).

As nanopartículas podem se concentrar no tecido alvo por diversos mecanismos. Em relação às neoplasias, o efeito de “ganho de permeabilidade e retenção” é conhecido: tumores são vascularizados, com permeabilidade vascular muito aumentada e prejuízo da drenagem linfática, favorecendo a entrada e a permanência das drogas, concentrando no tecido alvo (Moses *et al.*, 2021). Como visto anteriormente, endometriose e tumores compartilham comportamentos semelhantes e, como os últimos, a endometriose também apresenta fenômenos angiogênicos, com vascularização aumentada nos focos da doença, vasos neoformados e imaturos, além da associação com fatores que aumentam a permeabilidade vascular (VEGF – fator de crescimento endotelial vascular, prostaglandinas entre outros) (Moses *et al.*, 2021).

Além desta forma passiva de concentração no tecido alvo, temos também a forma ativa, que consiste na modificação das nanopartículas com o acréscimo de ligantes (peptídeos, anticorpos e pequenas moléculas), que podem se ligar a receptores específicos superexpressos nas células alvo, facilitando a internalização dessas nanopartículas modificadas pelas células de interesse, desenvolvendo novas estratégias terapêuticas (Garzon *et al.*, 2021; Moses *et al.*, 2021). Estudos mostraram que alguns receptores estão superexpressos tanto em câncer quanto em endometriose; desta forma estratégias inicialmente concebidas para o tratamento de cânceres poderiam ser adaptadas para o tratamento de endometriose (Moses *et al.*, 2021), abrindo um extenso campo de pesquisas nesta área, inclusive com imunoterapia, terapias fototérmicas e terapias gênicas (Ling *et al.*, 2021; Moses *et al.*, 2021). Trata-se do mecanismo utilizado neste estudo, de forma inovadora, utilizando receptores de colesterol LDL que se encontram superexpressos em focos de endometriose (Gibran *et al.*, 2017), à semelhança de células neoplásicas (Gabitova *et al.*, 2014) e associando a droga escolhida (MTX) à uma nanoemulsão lipídica semelhante a este colesterol, a LDE.

Esta nanoemulsão lipídica foi desenvolvida pela equipe do Dr. Raul Maranhão, no Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor e, a partir de uma série de estudos com drogas como paclitaxel (Rodrigues *et al.*, 2005; Graziani *et al.*, 2017), carmustina (Maranhão *et al.*, 2002), etoposide (Valduga *et al.*, 2003; Rohr *et al.*, 2020), e metotrexato (Moura *et al.*, 2011), ficou comprovado o acoplamento eficaz desses quimioterápicos com a LDE. Essas nanopartículas, ao serem injetadas na circulação, conseguiram se concentrar em células neoplásicas, carregando estes quimioterápicos testados, promovendo um efeito sítio-específico, reduzindo os efeitos colaterais da ação da droga em células saudáveis sem, no entanto, perder o efeito citotóxico da mesma. As respostas clínicas foram impressionantes no tratamento de pacientes oncológicos, que muitas vezes não tinham mais resposta com as terapias clínicas convencionais.

Em endometriose, estratégias para a “entrega” de drogas (*drug delivery*) estão sendo desenvolvidas tanto para novos medicamentos quanto para compostos já conhecidos, como substâncias antiinflamatórias, antioxidantes, antiangiogênicas ou imunomoduladoras (Garzon *et al.*, 2021). Além disso, as nanopartículas podem “liberar” substâncias terapêuticas em resposta ao uso de lasers, desencadeando efeitos fototérmicos, ondas de radiofrequência e ultrassons (Garzon *et al.*, 2021). Além das vantagens descritas com o uso da nanotecnologia para o tratamento da doença, temos possíveis vantagens também para o diagnóstico, com o uso de nanopartículas superparamagnéticas evidenciando os focos de endometriose no exame de ressonância, e também com o uso da fluorescência durante os procedimentos cirúrgicos favorecendo a identificação e remoção dos focos da doença (Moses *et al.*, 2021).

Podemos concluir que a nanotecnologia tem ainda um vasto horizonte a ser explorado, com diversas possibilidades dentro da medicina. Terapias promissoras para o tratamento de doenças e novas metodologias diagnósticas estão sendo desenvolvidas em diversos campos, com grande benefício para a sociedade.



## 5.7 Limitações

Algumas limitações para os resultados obtidos com este estudo podem ser observadas: o pequeno número de pacientes, a idade das pacientes participantes, cuja média foi de 40 anos, impactando nos resultados de avaliação de fertilidade, e a quantidade de doses da medicação realizadas, inferior ao previsto inicialmente, pelas limitações impostas pela pandemia. Um fator confundidor que deve ser considerado é o uso concomitante de medicações hormonais durante o período em que se desenvolveu a pesquisa. Este aspecto deve ser considerado na interpretação dos resultados; entretanto, é importante pontuar que todas as pacientes participantes apresentavam queixa álgica relevante mesmo com o uso crônico dessas medicações e houve melhora observada em comparação com o quadro inicial.

A média de idade das pacientes do estudo, que foi de 40 anos, é justificada por um dos critérios de inclusão, que era a ausência de desejo reprodutivo. Pelo fato de a endometriose ser uma doença que cursa com infertilidade em parcela representativa das pacientes, esta é uma queixa frequente nas portadoras da doença, principalmente nas que buscam tratamento cirúrgico.

## 5.8 Considerações Finais

Pacientes com endometriose profunda padecem pelas queixas álgicas, em maior ou menor grau, pelas dificuldades encontradas no âmbito do planejamento familiar, quando decidem ter filhos, pelo atraso no diagnóstico e na instituição da terapêutica adequada e, quando da decisão cirúrgica, das dificuldades técnicas e riscos inerentes ao procedimento, o que as torna mais vulneráveis à complicações (Abo *et al.*, 2018; Roman *et al.*, 2020; Vesale *et al.*, 2020). Soma-se a esses fatores a dificuldade presente nos serviços públicos de referência em absorver a demanda vinda da rede básica, e de oferecer tratamento cirúrgico para as pacientes com dor refratária ao tratamento clínico ou com infertilidade, quando não há possibilidade de recorrer às técnicas de reprodução assistida. A necessidade de equipe cirúrgica capacitada e de materiais específicos e de alto custo dentro da técnica laparoscópica,

considerada padrão-ouro, prejudica a fluidez na resolução destes casos. O resultado são grandes filas de espera, observadas nos melhores centros de referência do país.

Considerando o impacto econômico e social, há que se destacar que a paciente com endometriose apresenta piora da sua capacidade produtiva: cada mulher afetada tem uma média de perda de 10,8 horas de trabalho por semana (Nnoaham *et al.*, 2019), além de apresentar redução significativa da qualidade de vida e da função sexual (Tripoli *et al.*, 2011; Yela *et al.*, 2020). Um estudo com 254 mulheres com endometriose, pareadas com mulheres sem a doença, demonstrou que 43,3% das mulheres com endometriose apresentavam disfunção sexual, em comparação com 17,6% do grupo de mulheres sem a doença, com prejuízo em todas as fases da resposta sexual (Fairbanks *et al.*, 2017).

Todas as pacientes incluídas neste estudo eram portadoras de endometriose intestinal, com acometimento de pelo menos a camada muscular própria (Vercellini *et al.*, 2018), e tinham indicação cirúrgica por falha do tratamento clínico, com persistência da queixa algica. Foram selecionadas pacientes sem desejo reprodutivo, que estavam aguardando cirurgia há pelo menos 1 ano.

Há uma tendência da literatura em considerar o tratamento cirúrgico, no caso de lesões intestinais não obstrutivas e ausência de desejo reprodutivo, como um segundo passo após tratamento clínico, preferencialmente com progestágenos (Vercellini *et al.*, 2018). A cirurgia e seus riscos potenciais se reservariam, nesses casos, para pacientes com intolerância aos progestágenos, contraindicação ao uso dos mesmos e para aquelas que não apresentaram resposta satisfatória (Vercellini *et al.*, 2018). Considerando a heterogeneidade de tratamentos clínicos disponíveis, encontramos uma taxa de satisfação global ao redor de 66% para essa modalidade, o que estimula os esforços para o desenvolvimento de novas terapêuticas (Vercellini *et al.*, 2018).

O presente trabalho é um estudo clínico fase I/II, inédito em mulheres com endometriose, em que buscou-se avaliar segurança e eficácia no uso dessa apresentação da droga no tratamento dessas pacientes. É o primeiro estudo em

mulheres com o uso da nanomedicina para o tratamento da doença. Nossos resultados demonstraram a segurança do LDE-MTX, e a resposta clínica obtida com o tratamento encoraja pesquisas futuras com a medicação nesta apresentação, em casuísticas maiores, para confirmar a eficácia demonstrada no tratamento da dor pélvica.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos com a nossa pesquisa, podemos concluir que:

- a) Houve melhora significativa da dispareunia após 120 e 180 dias da medicação, sem diferença entre a quantidade de doses aplicadas;
- b) Houve melhora significativa da dor pélvica acíclica com ambas as doses da medicação, considerando o período global de avaliação;
- c) Houve melhora significativa da disquezia após 180 dias da medicação e essa melhora foi observada nas pacientes que receberam duas doses da medicação;
- d) Não houve eventos adversos graves, assim como não ocorreu sinais de mielotoxicidade nem de toxicidade hepática ou renal;
- e) Não houve mudança significativa no tamanho das lesões intestinais ao ultrassom, bem como das outras lesões pélvicas relacionadas à endometriose;
- f) Não houve redução nos níveis de hormônio anti-mulleriano antes e após 180 dias do tratamento.

## 7 ANEXOS

### Anexo A – Parecer do CEP – Hospital Pérola Byington

CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de droga anti-proliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE)

**Pesquisador:** ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 64669517.1.0000.0069

**Instituição Proponente:** CENTRO DE ESTUDO E PESQUISA DO HOSPITAL PEROLA BYINGTON

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.937.704

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo fase I/II do uso de metotrexato vetorizado em nanoemulsão lipídica, no tratamento da endometriose profunda. Teremos uma coorte pré-determinada de 15 pacientes, todas com queixa de dor pélvica crônica com escala visual analógica (AVS) 7 (Maxwell et al., 1978) e com USG pélvico e transvaginal com preparo intestinal comprobatório da presença de endometriose profunda intestinal. As pacientes classificadas para compor os três grupos serão submetidas a investigação criteriosa da presença de endometriose por meio de anamnese, exame físico e exame de imagem (Ultrassonografia Pélvica e Transvaginal com preparo intestinal). Serão candidatas a participarem do estudo, as pacientes que, após tratamento clínico convencional com medicações hormonais, não apresentarem resultados satisfatórios e mantiverem queixa de dor pélvica crônica com AVS 7 associada a resultado de ultrassonografia pélvica e transvaginal com preparo intestinal indicando a presença de lesão de endometriose profunda em retossigmóide, que esteja infiltrando a camada muscular própria, sem sinais de sub-oclusão da alça intestinal. Ao cumprirem os critérios de inclusão e exclusão, as pacientes serão randomizadas em 3 grupos cuja diferença será a quantidade de doses de metotrexato utilizadas. Das quinze pacientes iniciais, 5 irão compor o grupo 1, que receberá dose equivalente a 50mg/m<sup>2</sup>, divididos em 2 tomadas com intervalo

**Endereço:** Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683  
**Bairro:** Bela Vista **CEP:** 01.317-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3248-8087 **Fax:** (11)3248-8080 **E-mail:** dircient@ig.com.br

**CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM**

Continuação do Parecer: 1.937.704

semanal; 5 irão compor o grupo 2, que receberá dose equivalente a 75mg/m<sup>2</sup>, divididos em 3 tomadas com intervalo semanal; e 5 irão compor o grupo 3, que receberá o equivalente a 100mg/m<sup>2</sup> da droga, divididos em 4 tomadas, com intervalo semanal. A superfície corporal será calculada pela fórmula de DuBois, que leva em consideração peso e altura, os quais serão verificados no momento da consulta inicial. A medicação será administrada em esquema ambulatorial, dentro do Hospital Pérola Byington, a fim de monitorar os efeitos colaterais. As pacientes dos 3 grupos, retornarão para consulta após 5 dias de administração da droga para avaliação clínica e investigação de efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia, fadiga, tontura, sonolência e queda de cabelos. As pacientes dos 3 grupos, retornarão para consulta após 30, 90, 120 e 180 dias do final da administração da droga para investigação do quadro clínico associado a endometriose profunda e os sintomas serão comparados aos referidos anteriormente ao tratamento. Esta análise comparativa deverá utilizar a escala visual analógica de dor (AVS) para determinação quantitativa. As pacientes de todos os grupos realizarão USG Transvaginal com preparo intestinal após 30, 90 e 180 dias após o tratamento e as medidas dos nódulos anteriormente encontrados serão avaliadas para determinar a incidência de regressão por meio da análise de extensão e profundidade das lesões. Os exames serão realizados por um único radiologista cego ao estudo, com larga experiência no diagnóstico ultrassonográfico desta doença. As pacientes também repetirão as dosagens de hormônio anti mulleriano, FSH, LH Prolactina, TSH e T4 livre após 15, 90 e 180 dias para determinar se o uso de droga antiproliferativa promoveu quaisquer danos funcionais à hipófise, tireóide e ovários. Dosagens subsequentes dos testes sanguíneos hepáticos (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina, albumina, bilirrubinas), hemograma completo, uréia e creatinina serão realizadas 15, 30 e 90 dias após a infusão da emulsão, com o objetivo de monitorar a toxicidade ao tratamento. Além disso, serão submetidas à histeroscopia diagnóstica em fase do ciclo denominada proliferativa tardia (90 ao 120 dia do ciclo) onde será realizada biópsia do endométrio com o set de Betocchi e o material será enviado para estudo anátomo patológico para investigação de integridade do tecido e dateamento de fase do ciclo. Esta análise também visa identificar se haverá prejuízo ao endométrio tóxico, visando futuramente o mesmo tratamento em pacientes com endometriose profunda associada à infertilidade.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a eficácia do tratamento da dor pélvica em

Endereço:	Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683	
Bairro:	Bela Vista	CEP: 01.317-010
UF:	SP	Município: SAO PAULO
Telefone:	(11)3248-8087	Fax: (11)3248-8080 E-mail: dircient@ig.com.br

**CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM**



Continuação do Parecer: 1.937.704

pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal com o uso de droga anti-proliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE).

Objetivo Secundário:

- Comparar os níveis de dor pélvica antes e depois do tratamento em tempos distintos (30, 60, 90 e 180 dias)- Avaliar a resposta terapêutica com diferentes doses de metotrexato - Avaliar a incidência de efeitos colaterais associados ao uso de drogas anti-proliferativas acopladas em nanoemulsão lipídica (LDE-MTX)- Comparar os dados de imagem das lesões profundas intestinais descritas no USG Transvaginal com preparo intestinal antes e depois do tratamento em tempos distintos (30, 90 e 180 dias)- Comparar os níveis de hormônio anti-mulleriano, FSH, LH e a contagem de folículos antrais imediatamente antes e depois do tratamento clínico em tempos distintos (30, 90 e 180 dias).- Avaliar o endométrio das pacientes por meio de histeroscopia diagnóstica com biópsia, antes e depois do tratamento (180 dias), para determinar se houve alteração da resposta endometrial aos hormônios endógenos

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os estudos mostram, de uma forma geral, como efeitos colaterais do uso do metotrexato: a mielossupressão - diminuição na produção de células do sangue (0,6 - 4% dos pacientes), manifestações gastrointestinais - náuseas, vômitos, úlceras orais, falta de apetite (0,01 - 4% dos pacientes), queda de cabelo (0,2% dos pacientes), pneumonites - inflamação nos pulmões (0,4 - 0,8% dos pacientes), prejuízo no sistema nervoso central (1 - 3,7% dos pacientes), piora da função do rim (0,4 - 1,4% dos pacientes), perda de peso (1% dos pacientes), aumento das enzimas do fígado (3,2 - 4% dos pacientes), rash cutâneo - vermelhidão na pele (0,02% dos pacientes). Para o uso na dose que faremos neste estudo, que é uma dose utilizada no tratamento da gravidez ectópica, os efeitos colaterais relatados são leves e auto-limitados (desaparecem espontaneamente). Com o uso da medicação associada à nanoemulsão lipídica (LDE), espera-se uma importante diminuição dos efeitos colaterais, como foi observado em estudos anteriores para outras doenças com a medicação administradas desta forma

Endereço: Av. Brigadeiro Luitz Antonio, 683  
 Bairro: Bela Vista CEP: 01.317-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3248-8087 Fax: (11)3248-8080 E-mail: dircent@lg.com.br

**CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM**



Continuação do Parecer: 1.937.704

**Benefícios:**

Com esta pesquisa, tentaremos descobrir se o metotrexato poderá ser utilizado para o tratamento clínico da endometriose, ajudando pacientes que sofrem com a doença enquanto aguardam nas longas filas dos serviços públicos para uma cirurgia de alta complexidade que aliviará suas dores.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente estudo apresenta relevância clínica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com a resolução 466/12 da CONEP

**Recomendações:**

O estudo foi deferido

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Ausência de pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer do relator.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853813.pdf	08/02/2017 10:41:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ROBERTA_AVILA_FINAL.docx	08/02/2017 10:40:05	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_PESQUISADORES.pdf	08/02/2017 10:38:00	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ROBERTA_AVILA.docx	08/02/2017 10:04:34	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_estudo_rob.pdf	08/02/2017 10:03:33	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_ROBERTA_AVILA.docx	08/02/2017 10:01:49	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO	Aceito

Endereço: Av. Brigadeiro Lutz Antonio, 683  
 Bairro: Bela Vista CEP: 01.317-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3248-8087 Fax: (11)3248-8080 E-mail: dirclent@lg.com.br



CENTRO DE REFERÊNCIA DA  
SAÚDE DA MULHER - CRSM



Continuação do Parecer: 1.937.704

Cronograma	CRONOGRAMA_ROBERTA_AVILA.doc X	08/02/2017 10:01:49	TAVARES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_rob.pdf	08/02/2017 10:01:25	ROBERTA AVILA DO NASCIMENTO TAVARES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 22 de Fevereiro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Roberto Euzeblo dos Santos**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Brigadeiro Lutz Antonio, 683  
Bairro: Bela Vista CEP: 01.317-010  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3248-8087 Fax: (11)3248-8080 E-mail: dircent@ig.com.br

**Anexo B – Parecer do CEP – FMUSP**

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de droga anti-proliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE).

**Pesquisador:** Sérgio Podgaec

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 14291619.6.0000.0065

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.402.300

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo fase I/II do uso de metotrexato vetorizado em nanoemulsão lipídica, no tratamento da endometriose profunda. Desenvolvimento de uma coorte pré-determinada de 15 pacientes, todas com queixa de dor pélvica crônica com escala visual analógica (AVS) 7 (Maxwell et al., 1978) e com USG pélvico e transvaginal com preparo intestinal comprobatório da presença de endometriose profunda intestinal.

**Objetivo da Pesquisa:**

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a eficácia do tratamento da dor pélvica em pacientes portadoras de endometriose profunda intestinal com o uso de droga anti-proliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os estudos mostram, de uma forma geral, como efeitos colaterais do uso do metotrexato: a mielossupressão - diminuição na produção de células do sangue (0,6 - 4% dos pacientes), manifestações gastrointestinais - náuseas, vômitos, úlceras orais, falta de apetite (0,01 - 4% dos pacientes), queda de cabelo (0,2% dos pacientes), pneumonites - inflamação nos pulmões (0,4 - 0,8% dos pacientes), prejuízo no sistema nervoso central (1 - 3,7% dos pacientes), piora da função do rim (0,4 - 1,4% dos pacientes), perda de peso (1% dos pacientes), aumento das enzimas do fígado (3,2 - 4% dos pacientes), rash cutâneo - vermelhidão na pele (0,02% dos pacientes). Para o

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
**Bairro:** PACAEMBU **CEP:** 01.246-903  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.402.300

uso na dose que faremos neste estudo, que é uma dose utilizada no tratamento da gravidez ectópica, os efeitos colaterais relatados são leves e auto-limitados (desaparecem espontaneamente). Com o uso da medicação associada à nanoemulsão lipídica (LDE), espera-se uma importante diminuição dos efeitos colaterais, como foi observado em estudos anteriores para outras doenças com a medicação administradas desta forma.

**Benefícios:**

Com esta pesquisa, tentaremos descobrir se o metotrexato poderá ser utilizado para o tratamento clínico da endometriose, ajudando pacientes que sofrem com a doença enquanto aguardam nas longas filas dos serviços públicos para uma cirurgia de alta complexidade que aliviará suas dores

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo a ser conduzido no Hospital Pérola Byington com relevância clínica e no contexto de obtenção de título de mestrado na FMUSP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com a resolução 466/12 da CONEP

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não existem pendências para esse projeto e o mesmo já está aprovado tanto no Hospital Pérola Byington como pelo Conselho do DOG.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	folha.pdf	23/05/2019 13:54:15	Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira	Aceito
Outros	folha.pdf	23/05/2019 13:28:41	Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1285626.pdf	16/05/2019 10:37:14		Aceito
Outros	cadastroonline_FMUSP.pdf	16/05/2019 10:36:55	Sérgio Podgaec	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	17/04/2019 11:18:27	Sérgio Podgaec	Aceito
Outros	aprovacao_cep.pdf	17/04/2019 11:15:46	Sérgio Podgaec	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.402.300

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_final.docx	16/01/2019 11:36:08	Sérgio Podgaec	Aceito
Outros	aprovacao_crsm.pdf	16/01/2019 10:54:29	Sérgio Podgaec	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_aprovado.docx	16/01/2019 10:53:34	Sérgio Podgaec	Aceito
Cronograma	cronograma_final.docx	16/01/2019 10:53:22	Sérgio Podgaec	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

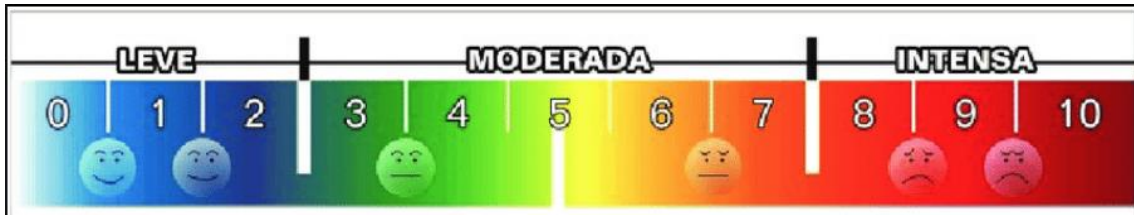
SAO PAULO, 19 de Junho de 2019

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira**  
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

**Anexo C** - Escala Visual Analógica de Dor – EVA (*Visual Analogue Scale – VAS*)



## Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER HOSPITAL PÉROLA BYINGTON

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME: .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F   
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 ENDEREÇO .....  
 Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CIDADE .....  
 CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F   
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
 ENDEREÇO: .....  
 Nº ..... APTO: .....  
 BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
 CEP: ..... TELEFONE: (.....) .....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Tratamento clínico de endometriose profunda com uso de droga anti-proliferativa (metotrexato) acoplado a nanoemulsão lipídica (LDE)”

PESQUISADOR: Roberta Ávila do Nascimento Tavares

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

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CREMESP 140527

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia do HCFMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input checked="" type="checkbox"/>

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

#### **4. SOBRE A PESQUISA:**

##### **4.1 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA**

A Senhora está sendo convidada a participar do estudo que vai avaliar a resposta clínica das pacientes com endometriose após o tratamento com metotrexato, uma medicação utilizada para o tratamento de diversas doenças não-ginecológicas e ginecológicas, inclusive o câncer.

Foi comprovado em estudo anterior que as pacientes portadoras de endometriose apresentam, nas lesões existentes no corpo causadas pela doença, número maior de receptores de um tipo de colesterol, o LDL. Isso significa que, nas mulheres com endometriose, os locais do corpo que têm a doença absorvem mais colesterol do que as outras células do corpo. Por isso, foi pensado em colocar essa medicação (metotrexate) dentro de uma partícula idêntica a LDL-colesterol (chamada LDE), para que ela “viaje” pelo corpo humano e vá até o foco de endometriose, e assim tratar a doença sem necessidade de cirurgia.

Este tratamento é experimental, ou seja, nunca foi realizado antes. Dentro das partículas de LDE será colocado o medicamento metotrexato, e como existe maior captação da LDE pelo foco de endometriose, haverá também maior concentração do medicamento no local da lesão. Essa preparação já passou por testes que garantem que ela pode ser injetada na circulação

O metotrexato, por sua vez, é uma medicação utilizada no tratamento de várias doenças benignas, como artrite reumatóide, dermatomiosite, psoríase, gravidez ectópica (gravidez nas trompas uterinas), e também para o tratamento de tumores (câncer), como leucemias (câncer do sangue), linfomas, coriocarcinoma (câncer relacionado à gravidez), etc Também é usado no tratamento de alguns tipos de câncer infantil. É uma medicação que tem atividade antiinflamatória (diminui a inflamação) e antiproliferativa (diminui a multiplicação das células).

Por possuir essas características, e também por já ser utilizado no tratamento de doenças ginecológicas, como a gravidez tubárea, a mola hidatiforme, o coriocarcinoma e também para o abortamento (nos países onde é permitido) pensamos em testá-la no tratamento da endometriose. Esse é o objetivo desta pesquisa!

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

A senhora fará uma série de exames de sangue, para atestar a saúde do seu organismo antes da utilização da medicação. Para a realização desses exames é necessário que você esteja de jejum 12 horas. A coleta do sangue pode causar um pequeno hematoma (roxo), como pode ocorrer em qualquer coleta para exames sanguíneos comuns, e se desfaz naturalmente em poucas horas ou dias. Fará também uma ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal, com profissional especializado, para mapeamento da endometriose. Fará uma entrevista comigo para saber ao certo o grau dos seus sintomas. Todos estes exames serão feitos antes e depois do tratamento. Como a Sra. já tem filhos ou não tem desejo de tê-los, caso ocorra qualquer alteração endometrial (dentro do útero), isso não trará qualquer repercussão a sua saúde.

Após esses procedimentos, se candidata ao estudo, você será sorteada dentre 15 pacientes, para compor três grupos que receberão o medicamento (metotrexato) incorporado à LDE, em doses escalonadas (diferentes). A LDE com medicamento será aplicada também em uma veia do seu braço, durante 2 horas.

Este tratamento será aplicado a cada semana, durante 4 semanas. Este procedimento será realizado no Hospital Pérola Byington. Nenhuma paciente saberá para qual grupo (de qual dose) foi sorteada.

Para a realização desse estudo você não poderá ter feito uso de medicações hormonais (anticoncepcionais, DIU com progesterona, etc) por um período de seis meses, ou deverá ter mantido as queixas de dor mesmo em uso das medicações referidas acima. Caso ocorra algum efeito colateral, você deve informar imediatamente ao pesquisador responsável, que irá decidir as providências a serem tomadas, podendo haver a interrupção do tratamento.

Após o uso da medicação, você deverá comparecer para acompanhamento 15, 30, 90, 120 e 180 dias, conforme calendário que você receberá, para realização de exames e entrevista com o pesquisador.

Com os dados conseguidos com esta pesquisa, teremos mais informações sobre o tratamento da endometriose, o que pode beneficiar novas técnicas e medicamentos para o tratamento desta doença. Além da Sra., essa pesquisa poderá beneficiar milhares de mulheres que sofrem com essa doença.

Convém lembrar que este é um tratamento novo e que você tem o direito de recusar-se a participar em qualquer momento ou fase da pesquisa, mesmo que já tenha concordado em participar. A Sra. será encaminhada para tratamento convencional, se assim desejar, e isso em nada irá mudar seu atendimento nessa Instituição.

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

Os estudos mostram, de uma forma geral, como efeitos colaterais do uso do metotrexato: a mielossupressão - diminuição na produção de células do sangue (0,6 - 4% dos pacientes), manifestações gastrointestinais - náuseas, vômitos, úlceras orais, falta de apetite (0,01 - 4% dos pacientes), queda de cabelo (0,2% dos pacientes), pneumonites - inflamação nos pulmões (0,4 - 0,8% dos pacientes), prejuízo no sistema nervoso central (1 - 3,7% dos pacientes), piora da função do rim (0,4 - 1,4% dos pacientes), perda de peso (1% dos pacientes), aumento das enzimas do fígado (3,2 - 4% dos pacientes), rash cutâneo - vermelhidão na pele (0,02% dos pacientes).

Para o uso na dose que faremos neste estudo, que é uma dose utilizada no tratamento da gravidez nas trompas, os efeitos colaterais relatados são leves e auto-limitados (desaparecem espontaneamente). Com o uso da medicação associada à nanoemulsão lipídica (LDE), espera-se uma importante diminuição dos efeitos colaterais, como foi observado em estudos anteriores para outras doenças com a medicação administradas desta forma.

#### **4.4 - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:**

Com esta pesquisa, da qual a senhora está participando, tentaremos descobrir se o metotrexato poderá ser utilizado para o tratamento clínico da endometriose, ajudando pacientes que sofrem com a doença enquanto aguardam nas longas filas dos serviços públicos para uma cirurgia de alta complexidade que aliviará suas dores.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que a senhora não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se a senhora não concordar em participar da pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento. Salientamos que a senhora tem a liberdade de retirar o consentimento em



qualquer fase da pesquisa sem prejuízos a seu cuidado e que terá direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa e toda assistência necessária caso assim o desejar. Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos no endereço abaixo especificado. Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) na rua Brigadeiro Luís Antonio, 683, Bela Vista - SP.

#### **4.5 - CUSTOS:**

A senhora não terá custos ao participar do estudo. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O participante será ressarcido das despesas de transporte para o hospital e, se necessário, das despesas de alimentação durante a realização do tratamento previsto no protocolo.

#### **5 - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:**

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

O pesquisador assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo. As informações obtidas com esta pesquisa serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

A Dra Roberta Ávila do Nascimento Tavares pode retirar a senhora do estudo sem o seu consentimento por qualquer uma das seguintes razões: a) com base em critérios para melhorar seu atendimento médico; b) se a senhora deixar de seguir o esquema do estudo; c) desenvolvimento de efeitos adversos importantes.

#### **6. INFORMAÇÕES DE NOME E TELEFONE DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:**

A Dra Roberta Ávila do Nascimento Tavares estará à sua disposição, a qualquer momento, para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito de sua endometriose, este estudo e sua participação.

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

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

***Dra. Roberta Ávila - tel: (19) 99294-8626***

**7 - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

---

---

**8 - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:**

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

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

São Paulo,        de                                de        .

---

Assinatura do paciente/ representante legal

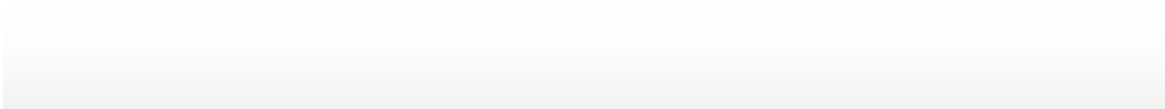
---

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

---



## 8 REFERÊNCIAS

1. Abo C, Moatassim S, Marty N, Saint Ghislain M, Huet E, Bridoux V, Tuech JJ, Roman H. Postoperative complications after bowel endometriosis surgery by shaving, disc excision, or segmental resection: a three-arm comparative analysis of 364 consecutive cases. *Fertil Steril*. 2018;109(1):172-178.e1.
2. Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(5):1115-30.
3. Abrao MS, Andres MP, da Cunha Vieira M, Borrelli GM, Neto JS. Clinical and Sonographic Progression of Bowel Endometriosis: 3-Year Follow-up. *Reprod Sci*. 2021;28(3):675-682.
4. Abrao MS, Gonçalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3092-7.
5. Abrão MS, Petraglia F, Falcone T, Keckstein J, Osuga Y, Chapron C. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):329-39.
6. Abrao MS, Podgaec S, Dias JA Jr, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF, Carvalho FM. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril*. 2006;86(3):543-7.
7. Agostini A, De Lapparent T, Collette E, Capelle M, Cravello L, Blanc B. In situ methotrexate injection for treatment of recurrent endometriotic cysts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;130(1):129-31

8. Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:795976.
9. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 193: Tubal Ectopic Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2018;131(3):e91-e103.
10. Anaf V, Simon P, Fayt I, Noel J. Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions. *Hum Reprod.* 2000;15(4):767-71.
11. Andres MP, Mendes RFP, Hernandez C, Araújo SEA, Podgaec S. Hormone treatment as first line therapy is safe and relieves pelvic pain in women with bowel endometriosis. *Einstein (Sao Paulo).* 2019;17(2):eAO4583.
12. Anjum S, Ishaque S, Fatima H, Farooq W, Hano C, Abbasi BH, Anjum I. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare Systems: Grand Challenges and Perspectives. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(8):707.
13. Aoshima M, Nagayama K, Takeshita K, Ajima H, Orikasa S, Iwazaki A, Takatori H, Oki Y. Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder with hypopituitarism and central diabetes insipidus. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2019;2019:19-0082.
14. Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005;97(1):178-82.
15. Babaei MR, Oveysi Kian M, Naderi Z, Khodaverdi S, Raofi Z, Javanmanesh F, Mohseni I, Nasiripour S, Farasatinasab M. Methotrexate infusion followed by uterine artery embolisation for the management of placental adhesive disorders: a case series. *Clin Radiol.* 2019;74(5):378-383.

16. Bafort C, Beebeejaun Y, Tomassetti C, Bosteels J, Duffy JM. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;10:CD011031.
17. Baia, Lusane L. (1997), As Equações de Estimação Generalizadas e Aplicações. Dissertação de Mestrado. Campinas: IMECC, Unicamp. pp 79.
18. Barnhart K, Esposito M, Coutifaris C. An update on the medical treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2000;27(3):653-67.
19. Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Daraï E. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2009;92(6):1825-33.
20. Bean E, Chaggar P, Thanatsis N, Dooley W, Bottomley C, Jurkovic D. Intra- and interobserver reproducibility of pelvic ultrasound for the detection and measurement of endometriotic lesions. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(2):hoaa001.
21. Bedin A, Maranhão RC, Tavares ER, Carvalho PO, Baracat EC, Podgaec S. Nanotechnology for the treatment of deep endometriosis: uptake of lipid core nanoparticles by LDL receptors in endometriotic foci. *Clinics (Sao Paulo).* 2019;74:e989.
22. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, Ralandison S, Gasque P. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5023.
23. Bellelis P, Frediani Barbeiro D, Gueuvoghlanian-Silva BY, Kalil J, Abrão MS, Podgaec S. Interleukin-15 and Interleukin-7 are the Major Cytokines to Maintain Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2019;84(5):435-444.
24. Benagiano G, Brosens I, Lippi D. The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;78(1):1-9.

25. Berlanda N, Somigliana E, Viganò P, Vercellini P. Safety of medical treatments for endometriosis. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;15(1):21-30.
26. Boots CE, Hill MJ, Feinberg EC, Lathi RB, Fowler SA, Jungheim ES. Methotrexate does not affect ovarian reserve or subsequent assisted reproductive technology outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(5):647-656.
27. Brichant G, Moïse A, Nisolle M. L'endométriose est-elle une pathologie inflammatoire ? [Endometriosis as an inflammatory disease ?]. *Rev Med Liege.* 2022;77(5-6):370-376.
28. Bulgarelli A, Leite AC Jr, Dias AA, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(6):531-9.
29. Casals G, Carrera M, Domínguez JA, Abrão MS, Carmona F. Impact of Surgery for Deep Infiltrative Endometriosis before In Vitro Fertilization: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2021:S1553-4650(21)00087-X.
30. Catenacci M, Sastry S, Falcone T. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 2009;52(3):351-61.
31. Ceccaroni M, Clarizia R, Bruni F, D'Urso E, Gagliardi ML, Roviglione G, Minelli L, Ruffo G. Nerve-sparing laparoscopic eradication of deep endometriosis with segmental rectal and parametrial resection: the Negrar method. A single-center, prospective, clinical trial. *Surg Endosc.* 2012;26(7):2029-45.
32. Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Fauconnier A, Barakat H, Dousset B. Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltrating endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002;9(2):115-9.

33. Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, Barakat H, Dousset B, Pansini V, Vacher-Lavenu MC, Dubuisson JB. Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod.* 2003;18(1):157-61.
34. Chowdhury NK, Deepika, Choudhury R, Sonawane GA, Mavinamar S, Lyu X, Pandey RP, Chang CM. Nanoparticles as an effective drug delivery system in COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 2021;143:112162.
35. Conover, W. J. & Iman, R. L. (1981), Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician*, 35, pp 124-129.
36. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 1990;53(6):978-83.
37. Darai E, Cohen J, Ballester M. Colorectal endometriosis and fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;209:86-94.
38. De Bennetot M, Rabischong B, Aublet-Cuvelier B, Belard F, Fernandez H, Bouyer J, Canis M, Pouly JL. Fertility after tubal ectopic pregnancy: results of a population-based study. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1271-6.
39. De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx P. Bowel resection for deep endometriosis: a systematic review. *BJOG.* 2011;118(3):285-91.
40. De Barros IBL, Malvezzi H, Gueuvoghlian-Silva BY, Piccinato CA, Rizzo LV, Podgaec S. "What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review". *J Reprod Immunol.* 2017;120:48-55.
41. de Paula Andres M, Borrelli GM, Kho RM, Abrão MS. The current management of deep endometriosis: a systematic review. *Minerva Ginecol.* 2017;69(6):587-596.

42. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):2766-74.
43. Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhão RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 59(1):105-11.
44. Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F, Brion P, Da Costa Ferreira N. Stereometric evaluation of peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum. *Hum Reprod.* 1996;11(1):224-8
45. Donnez J, Squifflet J. Complications, pregnancy and recurrence in a prospective series of 500 patients operated on by the shaving technique for deep rectovaginal endometriotic nodules. *Hum Reprod.* 2010;25(8):1949-58.
46. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition.* 1989;5(5):303-11.
47. Duffy JM, Arambage K, Correa FJ, Olive D, Farquhar C, Garry R, Barlow DH, Jacobson TZ. Laparoscopic surgery for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(4):CD011031.
48. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, Heikinheimo O, Horne AW, Kiesel L, Nap A, Prentice A, Saridogan E, Soriano D, Nelen W; European Society of Human Reproduction and Embryology. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2014;29(3):400-12.
49. Egekvist AG, Marinovskij E, Forman A, Kesmodel US, Graumann O, Seyer-Hansen M. Conservative treatment of rectosigmoid endometriosis: A prospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2019;98(9):1139-1147.



50. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.
51. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):235-58.
52. Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001;76(5):929-35.
53. Estlin EJ. Continuing therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of methotrexate, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *Cancer Treat Rev*. 2001;27(6):351-63.
54. Exacoustos C, Manganaro L, Zupi E. Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28(5):655-81.
55. Fairbanks F, Abdo CH, Baracat EC, Podgaec S. Endometriosis doubles the risk of sexual dysfunction: a cross-sectional study in a large amount of patients. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(7):544-547.
56. Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update*. 2005;11(6):595-606.
57. Fauconnier A, Chapron C, Dubuisson JB, Vieira M, Dousset B, Bréart G. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;78(4):719-26.
58. Feldkamp M, Carey JC. Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology*. 1993;47(6):533-9.

59. Ferrero S, Remorgida V, Maganza C, Venturini PL, Salvatore S, Papaleo E, Candiani M, Leone Roberti Maggiore U. Aromatase and endometriosis: estrogens play a role. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1317:17-23.
60. Fiorelli AI, Lourenço-Filho DD, Tavares ER, Carvalho PO, Marques AF, Gutierrez PS, Maranhão RC, Stolf NAG. Methotrexate associated to lipid core nanoparticles improves cardiac allograft vasculopathy and the inflammatory profile in a rabbit heart graft model. *Braz J Med Biol Res.* 2017;50(10):e6225.
61. Follmann D, Wu M. An approximate generalized linear model with random effects for informative missing data. *Int Biom Soc.* 1995;5(1):151–68.
62. Gabitova L, Gorin A, Astsaturov I. Molecular pathways: sterols and receptor signaling in cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(1):28-34.
63. Garzon S, Laganà AS, Barra F, Casarin J, Cromi A, Raffaelli R, Uccella S, Franchi M, Ghezzi F, Ferrero S. Novel drug delivery methods for improving efficacy of endometriosis treatments. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(3):355-367.
64. Gibran L, Maranhão RC, Tavares ER, Carvalho PO, Abrão MS, Podgaec S. mRNA levels of low-density lipoprotein receptors are overexpressed in the foci of deep bowel endometriosis. *Hum Reprod.* 2017;32(2):332-339.
65. Giorlandino C, Taramanni C, Muzii L, Santillo E, Nanni C, Vizzone A. Ultrasound-guided aspiration of ovarian endometriotic cysts. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993;43(1):41-4.
66. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364(9447):1789-99.
67. Goncalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Averbach M, Abrão MS. Transvaginal ultrasound for diagnosis of deeply infiltrating endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;104(2):156-60.
68. Goncalves MO, Podgaec S, Dias JA Jr, Gonzalez M, Abrao MS. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the

- number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. *Hum Reprod.* 2010;25(3):665-71.
69. Goncalves MO, Siufi Neto J, Andres MP, Siufi D, de Mattos LA, Abrao MS. Systematic evaluation of endometriosis by transvaginal ultrasound can accurately replace diagnostic laparoscopy, mainly for deep and ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2021:deab085.
70. Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amâncio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol.* 2002;85(3):493-7.
71. Graziani SR, Vital CG, Morikawa AT, Van Eyll BM, Fernandes Junior HJ, Kalil Filho R, Maranhão RC. Phase II study of paclitaxel associated with lipid core nanoparticles (LDE) as third-line treatment of patients with epithelial ovarian carcinoma. *Med Oncol.* 2017;34(9):151.
72. Guerriero S, Condous G, van den Bosch T, Valentin L, Leone FP, Van Schoubroeck D, Exacoustos C, Installé AJ, Martins WP, Abrao MS, Hudelist G, Bazot M, Alcazar JL, Gonçalves MO, Pascual MA, Ajossa S, Savelli L, Dunham R, Reid S, Menakaya U, Bourne T, Ferrero S, Leon M, Bignardi T, Holland T, Jurkovic D, Benacerraf B, Osuga Y, Somigliana E, Timmerman D. Systematic approach to sonographic evaluation of the pelvis in women with suspected endometriosis, including terms, definitions and measurements: a consensus opinion from the International Deep Endometriosis Analysis (IDEA) group. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):318-32.
73. Guido MC, Lopes NM, Albuquerque CI, Tavares ER, Jensen L, Carvalho PO, Tavoni TM, Dias RR, Pereira LDV, Laurindo FRM, Maranhão RC. Treatment With Methotrexate Associated With Lipid Core Nanoparticles Prevents Aortic Dilation in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:893774.

74. Hannoodee M, Mittal M. Methotrexate. 2021. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
75. Hendriks E, Rosenberg R, Prine L. Ectopic Pregnancy: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2020;101(10):599-606.
76. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2000; 30;343(22):1608-14.
77. Hider SL, Silman AJ, Thomson W, Lunt M, Bunn D, Symmons DP. Can clinical factors at presentation be used to predict outcome of treatment with methotrexate in patients with early inflammatory polyarthritis? *Ann Rheum Dis*. 2009;68(1):57-62.
78. Howard FM. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(5):540-50.
79. Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist*. 2016;21(12):1471-1482.
80. Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-density lipoprotein (LDL)receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 1978;52(6):1099-114.
81. Hudelist G, Ballard K, English J, Wright J, Banerjee S, Mastoroudes H, Thomas A, Singer CF, Keckstein J. Transvaginal sonography vs. clinical examination in the preoperative diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011a;37(4):480-7.
82. Hudelist G, English J, Thomas AE, Tinelli A, Singer CF, Keckstein J. Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound for non-invasive diagnosis of bowel endometriosis: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011b;37(3):257-63.

83. Huennekens FM. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul.* 1994;34:397-419.
84. Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR. Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(4):187-207.
85. Ianieri MM, Mautone D, Ceccaroni M. Recurrence in Deep Infiltrating Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *J Minim Invasive Gynecol.* 2018;25(5):786-793.
86. Imboden S, Bollinger Y, Härmä K, Knabben L, Fluri M, Nirgianakis K, Mohr S, Kuhn A, Mueller MD. Predictive Factors for Voiding Dysfunction after Surgery for Deep Infiltrating Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2021:S1553-4650(21)00037-6.
87. Indrielle-Kelly T, Frühauf F, Fanta M, Burgetova A, Lavu D, Dundr P, Cibula D, Fischerova D. Diagnostic Accuracy of Ultrasound and MRI in the Mapping of Deep Pelvic Endometriosis Using the International Deep Endometriosis Analysis (IDEA) Consensus. *Biomed Res Int.* 2020;2020:3583989.
88. Jacobson TZ, Duffy JM, Barlow D, Koninckx PR, Garry R. Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4).
89. Janssen NM, Genta MS. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy, and lactation. *Arch Intern Med.* 2000;160(5):610-9.
90. Kailajärvi M, Ahokoski O, Virtanen A, Salminen E, Irjala K. Alterations in laboratory test results during adjuvant breast cancer treatment. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(5):443-51.
91. Kamergorodsky G, Ribeiro PA, Galvão MA, Abrão MS, Donadio N, Lemos NL, Aoki T. Histologic classification of specimens from women affected by

- superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril*. 2009;92(6):2074-7.
92. Katturajan R, S V, Rasool M, Evan Prince S. Molecular toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis treatment: A novel perspective and therapeutic implications. *Toxicology*. 2021;461:152909.
93. Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland LV, Shigesu N, Terry KL, Harris HR, Roman H, Becker CM, As-Sanie S, Zondervan KT, Horne AW, Missmer SA. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2021;27(2):393-420.
94. Kivity S, Zafrir Y, Loebstein R, Pauzner R, Mouallem M, Mayan H. Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: a cohort of 28 patients. *Autoimmun Rev*. 2014;13(11):1109-13.
95. Kondo W, Branco AW, Trippia CH, Ribeiro R, Zomer MT. Retrocervical deep infiltrating endometriotic lesions larger than thirty millimeters are associated with an increased rate of ureteral involvement. *J Minim Invasive Gynecol*. 2013;20(1):100-3.
96. Koninckx PR, Deslandes A, Ussia A, Di Giovanni A, Hanan G, Tahlak M, Adamian L, Keckstein J, Wattiez A. Preoperative imaging of deep endometriosis: pitfalls of a diagnostic test before surgery. *Facts Views Vis Obgyn*. 2021;12(4):265-271.
97. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril*. 2012;98(3):564-71.
98. Kremer JM, Alarcón GS, Lightfoot RW Jr, Willkens RF, Furst DE, Williams HJ, Dent PB, Weinblatt ME. Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. *American College of Rheumatology. Arthritis Rheum*. 1994;37(3):316-28.

99. Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1370-82.
100. Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. *Cell Oncol (Dordr).* 2012;35(6):451-60.
101. Leenen S, Hermens M, de Vos van Steenwijk PJ, Bekkers RLM, van Esch EMG. Immunologic factors involved in the malignant transformation of endometriosis to endometriosis-associated ovarian carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(7):1821-1829.
102. Leonardo-Pinto JP, Benetti-Pinto CL, Cursino K, Yela DA. Dienogest and deep infiltrating endometriosis: The remission of symptoms is not related to endometriosis nodule remission. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;211:108-111.
103. Liang, K. Y. & Zeger, S. L. (1986), Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73, pp 13-22
104. Ling C, Wang X, Shen Y. Advances in Hollow Inorganic Nanomedicines for Photothermal-Based Therapies. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:493-513.
105. Liu H, Zhong W, Zhang X, Lin D, Wu J. Nanomedicine as a promising strategy for the theranostics of infectious diseases. *J Mater Chem B.* 2021;9(38):7878-7908.
106. Li W, LibinWeng. Examination on Risk Factors of Infertility Caused by EMT and Their Correlation with VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and IL-17. *Contrast Media Mol Imaging.* 2022:4421418.
107. Lloyd ME, Carr M, McElhatton P, Hall GM, Hughes RA. The effects of methotrexate on pregnancy, fertility and lactation. *QJM.* 1999;92(10):551-63.

108. Lopez-Olivo MA, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Suarez-Almazor ME. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;10;2014(6):CD000957.
109. Machairiotis N, Vasilakaki S, Thomakos N. Inflammatory Mediators and Pain in Endometriosis: A Systematic Review. *Biomedicines.* 2021;9(1):54.
110. Malvezzi H, Hernandez C, Piccinato CA, Podgaec S. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic review and meta-analysis. *Reproduction.* 2019;158(1):1-12.
111. Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993 Aug;28(8):691-6.
112. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994;54(17):4660-6.
113. Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49(6):487-98.
114. Maxwell C. Sensitivity and accuracy of the visual analogue scale: a psychophysical classroom experiment. *Br J Clin Pharmacol.* 1978;6(1):15-24.
115. Mello SB, Tavares ER, Bulgarelli A, Bonfá E, Maranhão RC. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:443-9.
116. Mello SB, Tavares ER, Guido MC, Bonfá E, Maranhão RC. Anti-inflammatory effects of intravenous methotrexate associated with lipid nanoemulsions on antigen-induced arthritis. *Clinics (Sao Paulo).* 2016;71(1):54-8.



117. Mesogitis S, Daskalakis G, Pilalis A, Papantoniou N, Thomakos N, Dessipris N, Koutra P, Antsaklis A. Management of ovarian cysts with aspiration and methotrexate injection. *Radiology*. 2005;235(2):668-73.
118. Minelli L, Fanfani F, Fagotti A, Ruffo G, Ceccaroni M, Mereu L, Landi S, Pomini P, Scambia G. Laparoscopic colorectal resection for bowel endometriosis: feasibility, complications, and clinical outcome. *Arch Surg*. 2009;144(3):234-9
119. Moradi Y, Shams-Beyranvand M, Khateri S, Gharahjeh S, Tehrani S, Varse F, Tiyyuri A, Najmi Z. A systematic review on the prevalence of endometriosis in women. *Indian J Med Res*. 2021;154(3):446-454.
120. Moses AS, Demessie AA, Taratula O, Korzun T, Slayden OD, Taratula O. Nanomedicines for Endometriosis: Lessons Learned from Cancer Research. *Small*. 2021;17(7):e2004975.
121. Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2285-95.
122. Netter A, d'Avout-Fourdinier P, Agostini A, Chanavaz-Lacheray I, Lampika M, Farella M, Hennetier C, Roman H. Progression of deep infiltrating rectosigmoid endometriotic nodules. *Hum Reprod*. 2019;34(11):2144-2152.
123. Nezhat C, Agarwal S, Lee DA, Tavallaee M. Can we accurately diagnose endometriosis without a diagnostic laparoscopy? *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2022;23(2):117-119.
124. Ngô C, Nicco C, Leconte M, Chéreau C, Weill B, Batteux F, Chapron C. Antiproliferative effects of anastrozole, methotrexate, and 5-fluorouracil on endometriosis in vitro and in vivo. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1632-8.
125. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997;68(4):585-96.

126. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, Jenkinson C, Kennedy SH, Zondervan KT; World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Reprint of: Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril*. 2019;112(4 Suppl1):e137-e152.
127. Nothnick W, Alali Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-186.
128. Ohannessian A, Loundou A, Courbière B, Cravello L, Agostini A. Ovarian responsiveness in women receiving fertility treatment after methotrexate for ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2014;29(9):1949-56.
129. Oron G, Tulandi T. A pragmatic and evidence-based management of ectopic pregnancy. *J Minim Invasive Gynecol*. 2013;20(4):446-54.
130. Oriol B, Barrio A, Pacheco A, Serna J, Zuzuarregui JL, Garcia-Velasco JA. Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not affect ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1579-82.
131. Padjen I, Crnogaj MR, Anić B. Conventional disease-modifying agents in rheumatoid arthritis - a review of their current use and role in treatment algorithms. *Reumatologia*. 2020;58(6):390-400.
132. Parasar P, Ozcan P, Terry KL. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2017;6(1):34-41.
133. Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(5):624-30.

134. Prey S, Paul C. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate-associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):622-8.
135. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373-9.
136. Rana P, Kazmi I, Singh R, Afzal M, Al-Abbasi FA, Aseeri A, Singh R, Khan R, Anwar F. Ectopic pregnancy: a review. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(4):747-57.
137. Revzin MV, Pellerito JS, Moshiri M, Katz DS, Nezami N, Kennedy A. Use of Methotrexate in Gynecologic and Obstetric Practice: What the Radiologist Needs to Know. *Radiographics*. 2021;41(6):1819-1838.
138. Riccio LDGC, Santulli P, Marcellin L, Abrão MS, Batteux F, Chapron C. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;50:39-49.
139. Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibañez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(6):565-76.
140. Rohr SS, Maranhão RC, Tavoni TM, Morikawa AT, Areco K, Deus DF, Oliveira JSR. Novel Approach for Bone Marrow Transplantation Conditioning in Acute Myelogenous Leukemia not Responding to the Induction Therapy Using Etoposide Carried in Lipid Core Nanoparticles: A Pilot Clinical Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(11):2027-2033.
141. Roman H, Bridoux V, Tuech JJ, Marpeau L, da Costa C, Savoye G, Puscasiu L. Bowel dysfunction before and after surgery for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2013.

142. Roman H, Bridoux V, Merlot B, Resch B, Chati R, Coget J, Forestier D, Tuech JJ. Risk of bowel fistula following surgical management of deep endometriosis of the rectosigmoid: a series of 1102 cases. *Hum Reprod.* 2020;35(7):1601-1611.
143. Roman H, Chanavaz-Lacheray I, Ballester M, Bendifallah S, Touleimat S, Tuech JJ, Farella M, Merlot B. High postoperative fertility rate following surgical management of colorectal endometriosis. *Hum Reprod.* 2018;33(9):1669-1676.
144. Rosowsky A, Forsch RA, Yu CS, Lazarus H, Beardsley GP. Methotrexate analogues. 21. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters. *J Med Chem.* 1984;27(5):605-9.
145. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Suarez Almazor M, Bridges SL Jr, Chatham WW, Hochberg M, MacLean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE; American College of Rheumatology. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;59(6):762-84.
146. Saccardi C, Cosmi E, Borghero A, Tregnaghi A, Dessole S, Litta P. Comparison between transvaginal sonography, saline contrast sonovaginography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of posterior deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;40(4):464-9.
147. Sahin C, Taylan E, Akdemir A, Ozgurel B, Taskiran D, Ergenoglu AM. The impact of salpingectomy and single-dose systemic methotrexate treatments on ovarian reserve in ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;205:150-2.

148. Sahin Ersoy G, Turhan OT, Sakin O, Bulut S. Comparison of the long-term effects of single-dose methotrexate and salpingectomy on ovarian reserve in terms of anti-müllerian hormone levels. *Hum Fertil (Camb)*. 2016;19(4):262-267.
149. Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(7):1100-4.
150. Samartzis EP, Labidi-Galy SI, Moschetta M, Uccello M, Kalaitzopoulos DR, Perez-Fidalgo JA, Boussios S. Endometriosis-associated ovarian carcinomas: insights into pathogenesis, diagnostics, and therapeutic targets-a narrative review. *Ann Transl Med*. 2020;8(24):1712.
151. Samy A, Taher A, Sileem SA, Abdelhakim AM, Fathi M, Haggag H, Ashour K, Ahmed SA, Shareef MA, AlAmodi AA, Keshta NHA, Shatat HBAE, Salah DM, Ali AS, El Kattan EAM, Elsherbini M. Medical therapy options for endometriosis related pain, which is better? A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021;50(1):101798.
152. Shafirir AL, Farland LV, Shah DK, Harris HR, Kvaskoff M, Zondervan K, Missmer SA. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;51:1-15.
153. Shawki H. E. The impact of in situ methotrexate injection after transvaginal ultrasound-guided aspiration of ovarian endometriomas on ovarian response and reproductive outcomes during IVF-cycles. *Middle East Fertility Society*. 2012;17(2):82-8.
154. Sherbini AA, Sharma SD, Gwinnutt JM, Hyrich KL, Verstappen SMM. Prevalence and predictors of adverse events with methotrexate mono- and combination- therapy for rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2021:keab304.

155. Shirazi M, Pooransari P, Hajiha N, Shaker Z, Ghazi M, Davari Tanha F, Ghorbani Yekta B, Ghaemi M. Effect of Single-Dose Methotrexate Treatment on Ovarian Reserve in Women with Ectopic Pregnancy Undergoing Infertility Treatment: A Single-Center Experience. *Int J Fertil Steril*. 2020;14(1):23-26.
156. Sindhvani S, Chan WCW. Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation. *J Intern Med*. 2021;290(3):486-498.
157. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, Bridges SL Jr, Chatham WW, Paulus HE, Suarez-Almazor M, Bombardier C, Dougados M, Khanna D, King CM, Leong AL, Matteson EL, Schousboe JT, Moynihan E, Kolba KS, Jain A, Volkman ER, Agrawal H, Bae S, Mudano AS, Patkar NM, Saag KG. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(5):625-39.
158. Singh JA, Saag KG, Bridges SL Jr, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, Vaysbrot E, McNaughton C, Osani M, Shmerling RH, Curtis JR, Furst DE, Parks D, Kavanaugh A, O'Dell J, King C, Leong A, Matteson EL, Schousboe JT, Drevlow B, Ginsberg S, Grober J, St Clair EW, Tindall E, Miller AS, McAlindon T; American College of Rheumatology. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(1):1-25.
159. Siufi Neto J, Kho RM, Siufi DF, Baracat EC, Anderson KS, Abrão MS. Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *J Minim Invasive Gynecol*. 2014;21(1):55-63.
160. Tang L, Li J, Zhao Q, Pan T, Zhong H, Wang W. Advanced and Innovative Nano-Systems for Anticancer Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1151.

161. Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50 Suppl 1:2-10.
162. Tirlapur SA, Daniels JP, Khan KS; MEDAL trial collaboration. Chronic pelvic pain: how does noninvasive imaging compare with diagnostic laparoscopy? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(6):445-8.
163. Tripoli TM, Sato H, Sartori MG, de Araujo FF, Girão MJ, Schor E. Evaluation of quality of life and sexual satisfaction in women suffering from chronic pelvic pain with or without endometriosis. *J Sex Med.* 2011;8(2):497-503.
164. Tschann P, Vitlarov N, Hufschmidt M, Lechner D, Girotti PNC, Offner F, Abendstein B, Königsrainer I. Colorectal resection in endometriosis patients: correlation between histopathological findings and postoperative outcome. *Eur J Med Res.* 2021;26(1):12.
165. Turco LC, Tortorella L, Tuscano A, Palumbo MA, Fagotti A, Uccella S, Fanfani F, Ferrandina G, Nicolotti N, Vargiu V, Lodoli C, Scaldaferrì F, Scambia G, Cosentino F. Surgery-related complications and long-term functional morbidity after segmental colo-rectal resection for deep infiltrating endometriosis (ENDO-RESECT morb). *Arch Gynecol Obstet.* 2020;302(4):983-993.
166. Valduga CJ, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CH, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich microemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as vehicle for etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55(12):1615-22.
167. van Mello NM, Mol F, Ankum WM, Mol BW, van der Veen F, Hajenius PJ. Ectopic pregnancy: how the diagnostic and therapeutic management has changed. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1066-73.
168. Varatharajan N, Lim IG, Anandacoomarasamy A, Russo R, Byth K, Spencer DG, Manolios N, Howe GB. Methotrexate: long-term safety and efficacy in an Australian consultant rheumatology practice. *Intern Med J.* 2009;39(4):228-36.

169. Verbene EA, de Haan E, van Tintelen JP, Lindhout D, van Haelst MM. Fetal methotrexate syndrome: A systematic review of case reports. *Reprod Toxicol.* 2019;87:125-139.
170. Vercellini P, Buggio L, Berlanda N, Barbara G, Somigliana E, Bosari S. Estrogen-progestins and progestins for the management of endometriosis. *Fertil Steril.* 2016;106(7):1552-1571.e2.
171. Vercellini P, Buggio L, Borghi A, Monti E, Gattei U, Frattaruolo MP. Medical treatment in the management of deep endometriosis infiltrating the proximal rectum and sigmoid colon: a comprehensive literature review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018;97(8):942-955.
172. Vercellini P, Buggio L, Somigliana E. Role of medical therapy in the management of deep rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril.* 2017;108(6):913-930.
173. Vesale E, Roman H, Moawad G, Benoit L, Touboul C, Darai E, Bendifallah S. Voiding Dysfunction after Colorectal Surgery for Endometriosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2020;27(7):1490-1502.e3.
174. Viganò P, Candiani M, Monno A, Giacomini E, Vercellini P, Somigliana E. Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Hum Reprod.* 2018;33(3):347-352.
175. Walden PA, Bagshawe KD. Pregnancies after chemotherapy for gestational trophoblastic tumours. *Lancet.* 1979;2(8154):1241.
176. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem.* 2018;158:502-516.
177. Wattiez A, et al. Surgical strategy in endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2013;27(3):381-92.



178. Wessels JA, Huizinga TW, Guchelaar HJ. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(3):249-55.
179. Winter MC. Treatment of low-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021:S1521-6934(21)00013-4.
180. Wolthuis AM, Meuleman C, Tomassetti C, D'Hooghe T, de Buck van Overstraeten A, D'Hoore A. Bowel endometriosis: colorectal surgeon's perspective in a multidisciplinary surgical team. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15616-23.
181. Woolas RP, Bower M, Newlands ES, Seckl M, Short D, Holden L. Influence of chemotherapy for gestational trophoblastic disease on subsequent pregnancy outcome. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998;105(9):1032-5.
182. Yela DA, Quagliato IP, Benetti-Pinto CL. Quality of Life in Women with Deep Endometriosis: A Cross-Sectional Study. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2020;42(2):90-95.
183. Zakhari A, Delpero E, McKeown S, Tomlinson G, Bougie O, Murji A. Endometriosis recurrence following post-operative hormonal suppression: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2021;27(1):96-107.
184. Zarou MM, Vazquez A, Vignir Helgason G. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*. 2021.
185. Zhang X, He T, Shen W. Comparison of physical examination, ultrasound techniques and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep infiltrating endometriosis: A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Exp Ther Med*. 2020;20(4):3208-3220.
186. Zhou WJ, Yang HL, Shao J, Mei J, Chang KK, Zhu R, Li MQ. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(11):2111-2132.

187. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1244-1256.