UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DA ASSOCIAÇÃO DE β-GLUCANA E ITRACONAZOL EM RATOS WISTAR

Rafael Stedile

Porto Alegre/RS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DA ASSOCIAÇÃO DE β-GLUCANA E ITRACONAZOL EM RATOS WISTAR

Autor:
Rafael Stedile

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias subárea: Morfologia, Cirugia e Patologia Animal.

Orientador:
João Roberto Braga de Mello

Porto Alegre/RS
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Stedile, Rafael
Estudo da toxicidade reprodutiva da associaçãode beta-glucana e itraconazol em ratos Wistar / Rafael Stedile. -- 2014.
82 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Terapêutica Veterinária. 2. Farmacologia Veterinária. 3. Toxicologia. 4. Reprodução Animal. 5. Patologia Veterinária. I. Mello, João Roberto Braga de, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Autor: Rafael Stedile

Título: Estudo da Toxicidade Reprodutiva da Associação de β-Glucana e Itraconazol em Ratos Wistar

Aprovado em 12 MAR 2014

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Prof. Dra. Ana Cristina Pacheco de Araujo
Membro da Comissão

_____

Prof. Dra. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

_____

Prof. Dra. Silvana Lima Górniak
Membro da Comissão

Dissertação desenvolvida no Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zé e Maninha.
Que construíram tudo que sou pessoal e profissionalmente.

A minha irmã Cláudia, que me cuida como mãe e que trouxe ao mundo uma pessoinha muito especial, Isabella.

À minha esposa, amiga e companheira Simone, a quem amo como pessoa e admiro como profissional.

À minha filhinha Luísa, projeto mais importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Doutor João Roberto Braga de Mello pela oportunidade, confiança e conselhos conferidos.

À professora Doutora Fernanda Bastos de Mello pelos conhecimentos repassados e auxílios prestados.

À Doutora Clarissa Boemler Hollenbach pela parceria, ensinamentos, paciência e amizade demonstrada. Essencial a este estudo.

À professora Doutora Simone Tostes de Oliveira Stedile, minha esposa, pelo amor, amizade, companherisimo e colaboração a execução do trabalho. Pela paciência de me ver distante.

À minha família, sempre presente mesmo que distante.

Ao professor Doutor Carlos Afonso de Castro Beck pelo ensino e amizade. Muito obrigado pela obstinada lapidagem.

À doutoranda Fabíola Peixoto de Mello, pela alegria, força e grande amizade apresentada. Ajudando desde a residência.

Ao professor doutor Félix Hilário Díaz Gonzalez e às pós-graduandas do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet) pelo auxílio laboratorial, ensinamentos e amizade.

Às acadêmicas Itatiele Farias Vivian, Luciana Machado Silva, Patrícia Pisoni Rosa, Rafaela Bing, Tatiana Larissa Schuch pelo auxílio essencial prestado durante a etapa experimental e zelo aos animais.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, especialmente aos do Biotério e do Departamento de Farmacologia.

Ao Hospital Veterinário e seus funcionários do Hospital de Clínicas Veterinárias pela disposição e auxílio.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma maneira colaboraram com a elaboração deste trabalho.

EPÍGRAFE

Não basta ensinar a um homem uma especialidade porque ele se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, de que é moralmente correto.

Albert Einstein

RESUMO

Nos últimos anos, o número de pacientes com infecções fúngicas sistêmicas e que necessitam de terapia com antifúngicos tem aumentado. Consequentemente, tornam-se frequentes os relatos de resistência aos tratamentos tradicionais. Desta maneira, novas alternativas terapêuticas surgem, incluindo a associação de β(1-3) glucana à terapia com itraconazol. Contudo, não são conhecidos os efeitos desta associação sobre o sistema reprodutivo e a fertilidade. O objetivo deste estudo foi identificar os efeitos da associação de itraconazol e β(1-3) glucana, extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a fertilidade de ratos, machos e fêmeas, e as possíveis interferências no desenvolvimento da progênie, incluindo potencial teratogênico. Foram estudados 240 ratos Wistar, separados em seis diferentes grupos (10 machos e 30 fêmeas por grupo): IT- tratados com 10 $mg.kg^{-1}$ de itraconazol por via oro-gástrica (VO) diariamente; Beta – tratados com 0,5mg de beta-glucana por via subcutânea (SC) semanalmente; DT, DT5x e DT10x – tratados com associação de beta-glucana (0,5 mg, SC) e três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 $mg.kg^{-1}$ (VO), respectivamente; e Controle – tratados com água destilada (VO) e solução de NaCl 0,9% (SC). Os machos foram tratados durante 70 dias pré-acasalamento e 21 dias de acasalamento; e as fêmeas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Foram avaliados: índices reprodutivos, incluindo parâmetros espermáticos, concentração sérica de testosterona e comportamento maternal; alterações esqueléticas fetais; e indicadores de desenvolvimento físico e neurolocomotor na progênie, incluindo comportamento em campo aberto e comportamento sexual. Com base nos resultados, conclui-se que as doses terapêuticas da ß-glucana e do itraconazol, isoladas ou em associação, não interferem nas variáveis reprodutivas estudadas em machos ou fêmeas, exceto taxa de perdas pós-implantação. As doses elevadas de itraconazol na associação com β-glucana demonstram alterar significativamente as variáveis reprodutivas de machos e fêmeas. Os resultados sugerem que os efeitos sobre a fertilidade do macho sejam funcionais. Salienta-se o potencial teratogênico e embriotóxico das doses mais elevadas de itraconazol associadas à β-glucana, como também atraso, apesar de discreto, em alguns parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes. Recomenda-se cautela na utilização de altas doses de itraconazol associado ou não a ß-glucana, principalmente em terapias prolongadas.

ABSTRACT

In recent years, the number of patients with systemic fungal infections requiring antifungal therapy has increased. As a consequence, antimicrobial resistance to conventional treatment is frequently reported. Because of that, new therapies emerge, including the combination of beta (1-3) glucan and itraconazole. However, the reproductive and fertility effects of this association were not known. So, the aim of this study was to identify the effects of the combination of itraconazole and beta (1-3) glucan, extracted from Saccharomyces cerevisiae, on male and female rats fertility, and the possible interference in the progeny development including teratogenic potential. Two hundred forty Wistar rats were separated into six groups (10 male and 30 female per group) IT- treated daily with 10 mg.kg $^{-1}$ itraconazole via orogastric; Beta - treated weekly with 0.5mg of β - glucan subcutaneously; DT, DT5x and DT10x - treated with a combination of β-glucan (0.5 mg) and three different doses of itraconazole, 10 , 50 and 100 mg.kg $^{-1}$, respectively; and Control -treated with distilled water orally and sterile NaCl 0.9 % subcutaneously. The male rats were treated before (70 days) and during the mating period (21 days); and the female rats were treated before (14 days) and during the mating period (up to 21 days), pregnancy (21 days) and lactation (21 days). The reproductive index, sperm parameters, serum testosterone concentration, maternal behavior, fetal skeletal changes, and indicators of physical and neuromotor development in the offspring, including open field behavior and sexual behavior, were evaluated. Based on the results, it is concluded that therapeutic doses of β -glucan and itraconazole, alone or in combination, do not interfere in the reproductive variables studied in males or females rats, excepted by the post-implantation losses rate. High doses of itraconazole in combination with β -glucan significantly alter the reproductive variables of males and females. The results suggest that the effects on male fertility are functional. It is emphasized the teratogenic and embryotoxic potential of higher doses of itraconazole associated with β-glucan, as well as a delay, although slight, in some parameters of the physical development of the offspring. Caution in the use of high doses of itraconazole associated or not with ß-glucan is recommended, especially in prolonged therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. OBJETIVO 13

2.1. OBJETIVO GERAL 13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

3.1. ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS 14
3.1.1. Itraconazol 14
3.2. B-GLUCANAS 18

4. ARTIGO 1 22

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BETA-GLUCANA E ITRACONAZOL SOBRE A FERTILIDADE DE RATOS WISTAR MACHOS 22

ABSTRACT 24
INTRODUÇÃO 26
MATERIAIS E MÉTODOS 26
Animais 26
Fármacos e preparação das soluções de tratamento 27
Delineamento experimental 27
Acasalamento e Avaliação da fertilidade 28
Dosagem de Testosterona 29
Avaliação dos órgãos 29
Avaliação dos parâmetros espermáticos 30
Análise estatística 31
RESULTADOS 31
Variação da massa corporal e consumos 31
Massa Relativa dos Órgãos e Avaliação Histológica 32
Parâmetros espermáticos e dosagem de testosterona 32
Taxas reprodutivas 32
DISCUSSÃO 32
CONCLUSÃO 35
SOURCES AND MANUFACTURERS 36
REFERENCES 36

5. ARTIGO 2 44

TOXICIDADE REPRODUTIVA DA ASSOCIAÇÃO DE ITRACONAZOL E BETA-GLUCANA EM RATAS E SUA PROGÊNIE 44

INTRODUÇÃO 46
MATERIAL E METODOS 46
Animais 46
Fármacos e preparação das soluções de tratamento 47
Delineamento experimental 47
Acasalamento e Avaliação da fertilidade 47
Gestação e Cesariana 47
Processo de diafanização de fetos e diagnóstico das alterações ósseas 48
Lactação e Comportamento Maternal 48

Desenvolvimento pós-natal da prole *48*
Eutanásia e avaliações da prole na puberdade *49*
Teste de comportamento em campo aberto *49*
Comportamento sexual *49*
Análises estatísticas *49*
RESULTADOS 50
Variação da massa corporal e consumos das fêmeas *50*
Taxas Reprodutivas *50*
Massa relativa dos órgãos e histologia (Fêmeas e Prole na Puberdade) *50*
Alterações esqueléticas dos fetos *50*
Comportamento Maternal *50*
Desenvolvimento pós-natal da prole *50*
Teste de Comportamento em Campo Aberto e Comportamento Sexual na prole *51*
Parâmetros espermáticos e concentração sérica de testosterona na puberdade *51*
DISCUSSÃO 51
REFERÊNCIAS 53

6. DISCUSSÃO GERAL 67

7. CONCLUSÕES 74

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A evolução da medicina possibilitou a descoberta e disponibilidade de novos tratamentos à população, permitindo maior sobrevivência dos pacientes. Muitas vezes a sobrevivência do indivíduo está relacionada àimunossupressão, como no caso de pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia intensa e de receptores de transplantes de órgãos sólidos. A imunossupressão pode ocorrer também de forma deletéria, não induzida, como nos casos de portadores de HIV ou de distúrbios hematológicos graves. Em ambos os casos de imunossupressão, tem sido observado nos últimos anos um aumento do número de pacientes com riscos de infecções fúngicas sistêmicas (MEIS e VERWEIJ, 2001; RÜPING et al., 2008).

Este aumento no número de pacientes em risco levou ao aumento no uso de antifúngicos, tanto na forma terapêutica como preventiva. Em contrapartida, tornou-se também frequente o relato de resistência aos fármacos mais utilizados, dentre estes o itraconazol. Esta resistência é bastante relevante nos casos envolvendo o gênero *Candida*, mas relatos de outros agentes infecciosos fúngicos, como *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus* tem sido freqüentes tanto em seres humanos quanto em animais (BOOGAERTS e MAERTENS, 2001; MEINERZ et al., 2007; SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2009; KHOSRAVI, 2009; LELIÈVRE et al., 2013). Com isso, novas alternativas terapêuticas para aumentar sua eficácia são necessárias para melhores resultados clínicos. Dentre estas, a β-glucana é uma das opções, principalmente associada aos antifúngicos tradicionais (AZEVEDO et al., 2008; SILVA et al., 2008; GARCIA et al. 2013). A β-glucana é considerada um imunofármaco, com ação estimulante do sistema imunológico, possuindo funções que estão associadas às atividades antitumorais, de radioproteção, aumento da resistência do hospedeiro em relação a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitária (PELIZON et al., 2005). Também têm sido relacionados efeitos anti-inflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

O itraconazol, assim como os demais triazóis, apresenta amplo espectro de ação com efeitos tóxicos reduzidos, se comparado aos antifúngicos mais antigos. Contudo, o itraconazol pode apresentar embriotoxicidade, teratogenia e toxidade materna (BRIGGS et al., 2001; COSTA e GÓRNIAK, 2006). Os azólicos, que inclui os triazólicos,

possuem interação com várias classes de fármacos. A interação do itraconazol com outros fármacos vem sendo extensivamente estudada. É importante lembrar que fármacos que não possuem dados que suportem esta interação não significam que haja ausência desta (ZONIOS e BENNETT, 2008).

A β-glucana possui atividade desmutagênica e bioantimutagênica frente a agentes mutagênicos. Esta capacidade protetora deve ser considerada nas interações com outros fármacos (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007), pois demonstra que a β-glucana pode diminuir a toxicidade destes. Com o crescente uso da associação do itraconazol e β-glucana no tratamento de doenças fúngicas em humanos e animais, torna-se necessário maior entendimento da interação entre estes fármacos. Os conhecimentos devem incluir o potencial efeito desta associação sobre a fertilidade, necessitando estudos específicos sobre a sua toxicidade reprodutiva, que devem seguir protocolos internacionais.

O estudo é classificado como grau de severidade leve, pois a administração dos fármacos ocorrereu via subcutânea e por gavagem com volumes dentro dos limites para a espécie. A administração das substâncias não acarretarou impacto maior do que leve para os animais. A eutanásia foi realizada de forma ética, seguindo as legislações vigentes. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS (protocolo no 19452/2010).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Esclarecer os potenciais efeitos, benéficos ou não, da associação de itraconazol e β (1-3) glucana, principalmente relacionados à toxicidade reprodutiva.

2.2. Objetivos específicos

Identificar os efeitos da associação de itraconazol e β (1-3) glucana em ratos Wistar sobre:

- a fertilidade, a formação, maturação e morfologia espermática em machos tratados 91 dias antes e durante o acasalamento
- o acasalamento, as taxas reprodutivas, a gestação, o parto, a lactação e o comportamento maternal em fêmeas tratadas 14 dias antes e durante o acasalamento, gestação e lactação.

- as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese e a possibilidade de produzir efeitos teratogênicos.
- o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Antifúngicos azólicos

Os fármacos azólicos atuam como antifúngicos inibindo a citocromo P450 fúngico, acarretando alterações na membrana que levam à morte do agente infeccioso (MEIS e VERWEIJ, 2001). Os azólicos são classificados em dois grupos, os imidazólicos, que inclui miconazol, econazol, clotrimazol e cetoconazol, e os triazólicos, onde estão inclusos o itraconazol, fluconazol e voriconazol (TABOADA e GROOTERS, 2008).

Os imidazóis foram os primeiros antifúngicos azólicos a serem descobertos, em meados do século passado, sendo que em 1967 o nitrato de imidazol foi utilizado pela primeira vez de forma experimental (NOBRE et al., 2002). Mais recentemente, antifúngicos dos grupos dos triazóis, tais como o itraconazol, surgiram como alternativa terapêutica eficaz, com menos efeitos colaterais comparados aos outros antifúngicos e com ação frente a diversas espécies de fungos patogênicos (MEINERZ et al., 2007). Além das aplicações clínicas, os antifúngicos triazólicos são utilizados na agricultura (GOETZ et al., 2007).

3.1.1. Itraconazol

O itraconazol é um agente antifúngico de amplo espectro de atividade com características químicas de um bis-triazólico decorrentes da substituição do anel imidazólico por triazólico (CAZEDEY et al., 2007). A presença de três átomos de nitrogênio resulta em um aumento da afinidade, e consequentemente maior inibição, ao citocromo P450 fúngico (PANDYA et al., 2003). A eficicácia deste fármaco está também relacionada ao seu principal metabólito, o hidroxi-itraconazol (BEULE e GESTEL, 2001; WILLEMS et al., 2001), que possui atividade antifúngica equivalente ao fármaco original (ZONIOS e BENNETT, 2008).

O mecanismo de ação está relacionado à inibição do crescimento do fungo através da interferência na síntese de ergosterol, um componente vital da membrana das células fúngicas. O itraconazol age bloqueando a reação de 14α-desmetilação pelo citocromo P450 fúngico, impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol. O bloqueio da síntese do ergosterol e o acúmulo de lanosteral causam várias alterações do sistema enzimático e aumento da permeabilidade da membrana fúngica. Estas modificações na membrana conduzem à difusão de potássio intracelular e à morte celular. (BEULE e GESTEL, 2001; FARIAS e GIUFFRIDA, 2002; CAZEDEY et al., 2007). Os azólicos podem produzir acúmulo de peróxido de hidrogênio que pode acarretar em lesão das estruturas das organelas intracelulares do fungo (CATALÁN e MONTEJO, 2006).

O itraconazol possui forte ligação com as proteínas plasmáticas (principalmente albumina) e células sanguíneas, sendo que apenas 0,2% deste fármaco circula de forma não-ligada (BEULE e GESTEL, 2001; CAZEDEY et al., 2007). Consequentemente, são encontradas baixas concentrações de itraconazol na maioria dos fluidos corporais, tais como fluido cerebrospinal e fluido intraocular. Por outro lado, altas concentrações podem ser obtidas em tecidos como pulmões, rins, fígado, ossos, estômago, baço e músculos (BEULE e GESTEL, 2001; WILLEMS et al., 2001). Pode atingir concentrações significativas no tecido neurológico, apesar da baixa concentração no fluido cerebrospinal (FARIAS e GIUFFRIDA, 2002). Esta ligação com proteínas e tecidos é clinicamente relevante, pois promove acúmulo deste fármaco em locais frequentemente afetados por infecções fúngicas sistêmicas, tais como pulmões e baço (MEIS e VERWEIJ, 2001). O itraconazol pode alcançar altas concentrações em pele e secreção sebácea, de quatro a dez vezes a concentração no soro. Isto ocorre devido à capacidade de se ligar fortemente à proteína ceratina, levando um acúmulo nos ceratócitos, de ser eliminado via secreção sebácea e a sua alta lipossolubilidade. Estas características o tornam muito efetivo em doenças micóticas cutâneas (BEULE e GESTEL, 2001; FARIAS e GIUFFRIDA, 2002; NOBRE et al., 2002). O itraconazol possui atividade *in vitro* e *in vivo* contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton* spp., e contra fungos dimórficos, tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei*, e *Sporothrix schenckii* (ZONIOS e BENNETT, 2008).

A absorção do itraconazol na formulação em cápsula apresenta grande variação, influenciada principalmente pelo pH do ambiente gástrico ácido e pela presença de alimentos. A sua biodisponibilidade atinge seu máximo quando administrada após a alimentação, alcançando seu pico plasmático em 3 a 4 horas. Consequentemente, pacientes que não estão suportando alimentação oral podem apresentar redução na absorção deste fármaco (WILLEMS et al., 2001; FARIAS e GIUFFRIDA, 2002; NOBRE et al., 2002). Estudos tem demonstrado que o itraconazol possui volume de distribuição (aproximadamente 11L/kg) e meia-vida de eliminação muito maior do que outros imidazóis. Também mantem uma estável concentração em tecidos as quais são maiores do que as plasmáticas em doses repetidas (PRENTICE e GLASMACHER, 2005). Encontra-se na literatura como dose terapêutica de referência: 5- 10 $mg.kg^{-1}$ em cães; 10 $mg.kg^{-1}$ em gatos (TABOADA e GROOTERS, 2008); 10 $mg.kg^{-1}$ em ratos (MARTINS, 2008) e 100-400 mg em humanos (LESTNER et al., 2009).

A biotransformação do itraconazol ocorre primariamente no fígado utilizando grande número de vias. Dessa biotransformação resultam mais de 30 metabólitos, sendo que o principal é o hidroxi-itraconazol, que possui atividade antifúngica. A eliminação do itraconazol é bifásica, com meia-vida de aproximadamente 20-24 horas depois de uma única dose, aumentando para 30 horas em estado estacionário. Este estado é alcançado após quatro dias de tratamento. A maioria dos metabólitos é eliminada via biliar e urinária, contudo o itraconazol não biotransformado não é detectado na urina (BEULE e GESTEL, 2001; ZONIOS e BENNETT, 2008). O hidroxi-itraconazol é eliminado via bile, sofrendo recirculação entero-hepática, com uma meia-vida de 8 a 12 horas (FARIAS e GIUFFRIDA, 2002).

Lestner et al. (2009) demonstraram um aumento progressivo na probabilidade de toxicidade com o aumento da concentração sanguínea do itraconazol. Neste estudo 46% dos pacientes humanos apresentaram efeitos adversos, sendo que os mais frequentes foram a retenção de líquidos e alterações gastrintestinais, tais como náusea, vômito, dor abdominal, flatulência e diarréia. Menos comumente foram observados urticária, cefaléia, tremor, neuropatia periférica, distúrbio do sono, Síndrome de Cushing e aumento da dosagem de insulina em pacientes diabéticos e de anti-hipertensivos em pacientes hipertensos medicados. Outras pesquisas também observaram em menor frequência insuficiência cardíaca, hipertrigliceridemia, hipocalemia, rabdomiólise e elevação das enzimas hepáticas (TUCKER et al., 1990; SHARKEY at al., 1991; ZONIOS e BENNETT, 2008). Apesar de alguns estudos sugerirem a possibilidade do

itraconazol causar a hiperaldosteronismo (Síndrome de Conn), Skov et al. (2002) encontraram níveis normais de renina plasmática, indicando não haver alterações de mineralocorticóides em humanos. Por outro lado, Meinerz et al. (2007) não observaram alterações nos exames hematológicos, de enzimas hepáticas ou histopatológico em ratos Wistar submetidos a altas doses de itraconazol (100 $mg.kg^{-1}$) via oral por 30 dias. A potencial toxicidade do itraconazol em mamíferos está relacionada à capacidade de modular a expressão de genes e à atividade enzimática vinculadas ao citocromo P450 mamíferos, assim como interferências em outras enzimas metabólicas do fígado e outros tecidos (GOETZ et al., 2007).

Os azólicos podem causar embriotoxicidade, teratogenia e toxidade materna, não sendo recomendado a pacientes gestantes (COSTA e GÓRNIAK, 2006; MARTINEZ, 2006). Fenda palatina e defeitos em membros foram observados após uma única exposição ao itraconazol entre o nono e o décimo primeiro dia de gestação em ratas. A fenda palatina foi a alteração mais encontrada, contudo apenas nas doses acima de 150 $mg.kg^{-1}$. Entre o oitavo e nono dias de gestação foram verificadas exclusivamente defeitos do esqueleto axial (TIBONI et al., 2006). Os mecanismos envolvidos na teratogenicidade dos azólicos ainda não estão bem esclarecidos, contudo existem evidências de que a interferência na homeostase do ácido retinóico embriônico esteja relacionada (MAROTTA e TIBONI, 2010). Também foi demonstrado em ratas que o cetoconazol, um fármaco azólico, possui efeito sobre a placenta, causando hipertrofia da mesma decorrente do aumento da população de células que compões o labirinto e zona basal da placenta (FURUKAWA et al., 2008).

A fertilidade masculina também pode ser afetada pelos azólicos. Em homens, apesar de discreta, a administração de fluconazol ocasionou efeitos na concentração de testosterona e corticosteróides e na resposta do cortisol à estimulação por ACTH (DIFLUCAN, 2010). A administração diária de fluconazol em coelhos provocou diminuição do volume seminal, da contagem e da motilidade espermática, no entanto estas alterações foram reversíveis (EL-MEDANY e HAGAR, 2002). A diminuição da fertilidade também foi observada em camundongos tratados com cetoconazol, com declínio da motilidade e densidade espermática (JOSHI et al., 1994). Essa ruptura da homeostase da testosterona parece estar envolvida na toxicidade reprodutiva dos antifúngicos azólicos, tanto diminuindo como aumentando a concentração de testosterona. Se, de um lado, alguns antifúngicos azólicos, tais como cetoconazol, econazol e miconazol diminuem os níveis de testosterona, ocasionando efeitos

desmasculinizantes, evidenciados pela diminuição da distância anorretal de fetos machos de ratos (KJÆRSTAD et al., 2010), por outro lado, altas doses de triazólicos, foram relacionadas com aumento da testosterona sérica, do peso dos testículos e da distância anorretal em fetos de ratos, o que indica hipervirilização (GOETZ et al., 2007).

Pressupõe-se que os azóis interfiram na homeostase do ácido retinóico embriônico, através da inibição sistema enzimático do citocromo P450 dos mamíferos, especialmente o CYP26 (GIAVINI e MENEGOLA, 2010, MAROTTA e TIBONI, 2010). Os metabólitos do ácido retinóico possuem importante papel no desenvolvimento dos fetos, modificando expressões de genes específicos (ROSS et al., 2000), podendo a inibição deste sistema ocasionar defeitos teratogênicos.

Várias classes de fármacos possuem interação com os azólicos, tanto por redução dos níveis séricos do antifúngico, como nos casos de associação com rifampicina, isoniazida, fenitoína, fenobarbital e carbamazepina, quanto por elevação dos níveis dos outros fármacos, como ocorre com ciclosporina, digoxina, terfenadina, warfarina, benzodiazepínicos e inibidores de protease do vírus da imunodeficiência humana (MARTINEZ, 2006). A lista de medicamentos que interagem com os azólicos é bastante ampla e está em constante expansão. A interação da maioria dos fármacos resulta da inibição competitiva do metabolismo oxidativo hepático via ligação reversível rápida pelo citocromo P450, mais especificamente com CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C19. O itraconazol também é inibidor da glicoproteína-P gástrica, que é uma bomba de efluxo ATP-dependente. Esta glicoproteína inibe a absorção gastrintestinal de vários fármacos, assim, a interferência nesta bomba leva ao aumento da exposição sistêmica de fármacos afetados por este transporte (ZONIOS e BENNETT, 2008).

3.2. β-glucanas

As β-glucanas não-celulósicas foram descritas há algumas décadas como componentes de diversas plantas e microrganismos. Muitas pesquisas têm comprovado efeitos biológicos favoráveis da utilização destas glucanas em mamíferos, com potencial benefício no tratamento de várias doenças, principalmente doenças infecciosas. Estes benefícios estão relacionados principalmente a sua capacidade imunomodulatória, sendo considerado um potente estimulante imunológico (AKRAMIENE et al., 2007; CHEN e SEVIOUR, 2007). A capacidade de modulação imune das β-glucanas está relacionada não somente ao aumento das atividades dos macrófagos, mas também de neutrófilos,

células NK e linfócitos B e T, interferindo tanto na resposta humoral como na celular. As β-glucanas estimulam a fagocitose pelos macrófagos e a produção/liberação de mediadores da inflamação, tais como prostaglandina E_2, óxido nítrico, radicais livres de oxigênio, interleucinas e fator de necrose tumoral (ESTRADA et al., 1997; AKRAMIENE et al., 2007). O sistema imune do hospedeiro possui receptores específicos para as β-glucanas presentes na maioria das células apresentadoras de antígenos, incluindo macrófagos e células dentríticas. Estudos têm demonstrado que a dectin-1, uma proteína transmenbrânica tipo II, é o principal receptor responsável pela ligação com a β(1-3) glucana e β(1-6) glucana, embora outros receptores como CR3, lactosilceramida e scavenger também estejam envolvidos (AKRAMIENE et al., 2007; CHAUNG et al., 2009).

As características imunofarmacológicas das β-glucanas estão associadas a atividades antitumorais, de radioproteção, aumento da resistência do hospedeiro em relação a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitária (PELIZON et al., 2005). Também tem sido relacionados efeitos anti-inflamatório, antimutagênico, hipocolesterolêmico, hipoglicêmico (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008), na proteção miocárdica após lesão de isquemia/reperfusão, na cicatrização de feridas (CHAUNG et al., 2009) e com capacidade desmutagênica e bioantimutagênica frente a agentes mutagênicos (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

A β-glucana é um polissacarídeo encontrado em grande concentração em paredes celulares de espécies de fungos, leveduras e de alguns cereais (ESTRADA et al., 1997; YUN et al., 1998). As β-glucanas possuem diferentes estruturas dependendo de sua origem. As glucanas são um grupo heterogêneo de polímeros de glicose, consistindo de polímeros de β-1,3-D-glicopiranose, podendo ou não possuir ramificações laterais. As variações destas ramificações afetam a solubilidade em água das glucanas (SILVA et al., 2006; AKRAMIENE et al., 2007). A solubilidade em água está relacionada ao número de resíduos de glicose unidos em β(1-6) das cadeias laterais, e do grau de polimerização (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

A *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como levedura da fermentação, representa uma grande fonte de β-glucanas, principalmente de β(1-3) glucana, que é um polímero de glicose com ligações β(1-3). A parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* representa 10-15% do peso seco desta levedura e é constituída principalmente de quatro componentes: mananaproteínas (30-50%), β(1-6) glucana (5-10%), β(1-3) glucana (30-45%) e quitina (1,5-6%). A β(1-3) glucana e a quitina fazem parte da camada interna da

membrana desta levedura, enquanto a mananaproteínas constitui a camada externa. A camada externa limita a acessibilidade da membrana interna, que contem a β(1-3) glucana, aos eventos de reconhecimento célula-célula. A β(1-6) glucana participa da conexão da camada interna com a externa (KLIS et al., 2002; KLIS et al., 2006). O tamanho aproximado das β(1-3) glucanas é estimado de 1500 resíduos de glicose, enquanto as β(1-6) glucanas apresentam de 150 a 200 resíduos. A β-glucana da *Saccharomyces cerevisiae* possui um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β(1-3), com cadeias laterais unidas em β(1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e tamanhos variados. Geralmente, o nome genérico de β(1-3) glucana é utilizado tanto para se referir a glucanas com apenas ligações β(1-3), mas também para aquelas que possuem além das ligações β(1-3), porções variadas de ligações β(1-4) e β(1-6) conectadas a cadeia principal (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Tem sido demonstrado que a β-glucana estimula amplo efeito antimicrobiano, evidenciado por estudos envolvendo *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, Paracoccidioides brasiliensis, Sporothrix schenckii, Eimeria vermiformi, Pneumocystis carinii, Listeria monocytogenes, Fonsecaea pedrosoi, Leishmania donovani, Influenza virus*. A associação de itraconazol e β-glucana têm mostrado resultados promissores no tratamento de várias afecções fúngicas, tanto experimentalmente como em casos clínicos refratários ao uso isolado de antifúngicos em altas doses (YUN et al., 1998; AKRAMIENE et al., 2007; AZEVEDO et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Em estudos experimentais, a administração de β-glucana resultou em melhora clínica e maior taxa de sobrevivência em animais com sepse induzida, exercendo uma proteção contra a formação de colônias bacterianas no líquido peritoneal e aumentando a migração leucocitária (CRISPIM et al., 2004).

A beta-glucana também tem sido utilizada como promotora de crescimento. Contudo, os resultados tem se mostrado contraditórios em relação ao ganho de peso, com alguns estudos com efeitos positivos e outros sem demonstrar influência. A ação como promotor de crescimento está relacionada à ação imunoestimulante, melhorando a imunidade durante a fase mais susceptível as infecções (HISS e SAUERWEIN, 2003; HAHN et al., 2006; COX et al., 2010).

Observou-se que a beta-glucana tem potencial reduzir ou mesmo bloquear a imunossupressão causada por agentes tóxicos. Existem duas hipóteses para explicar tal

efeito: estímulo simples de reação do sistema imune frente aos efeitos da toxina; regulação positiva ou negativa de alguns genes importantes, tais como ERCC5, CASP9, CYPIAI, CDC42, OKC, BCl-2 ou NF-κB. Contudo estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos (VETVICKA, 2013)

Em estudo com crianças, os efeitos adversos da β-glucana foram considerados baixos e de pouca importância clínica, não sendo necessária a suspensão do tratamento na maioria dos casos. O principal efeito relatado foi dor local no início do tratamento, reduzindo posteriormente. Alguns pacientes podem apresentar de forma transitória febre, mialgia, cefaléia e formação de nódulos (RIZZO et al., 2008). Em estudo de toxicidade aguda com lentinan, uma beta-glucana extraída do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*), não foi observado sinais de toxicidade grave em doses até 2500 $mg.kg^{-1}$, administrados via oral, intraperitoneal ou subcutâneo (MORIYOKI e ICHIMURA, 1980).

CAPÍTULO 2

4. ARTIGO 1

Efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de ratos Wistar machos

Publicado na Acta Scientiae Veterinariae[1]

[1] Acta Scientiae Veterinariae, 55: 1167, 2013. Disponível em: http://www.ufrgs.br/actavet/41/PUB%201167.pdf

Efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de ratos Wistar machos

Effects of the association of geta-glucan and itraconazole on fertility of male Wistar rats

Rafael Stedile[2], Clarissa Boemler Hollenbach[1], Fernanda Bastos de Mello[2], Fabíola Peixoto da Silva Mello[1], Rafaela Bing[3], Patrícia Pisoni Rosa[3], Luciana Machado Silva[3], Itatiele Farias Vivian[3] & João Roberto Braga de Mello[4]

[2] Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. [2] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil. [3] Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. [4] Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. CORRESPONDENCIA: R. Stedile [stediler@gmail.com] Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Rua Fernandes de Barros, 685, Bairro Alto da XV, CEP 80045-390, Curitiba, PR, Brasil. F. P. S. Mello [fabiolapsm@yahoo.com.br].

Efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de ratos Wistar machos

ABSTRACT

Background: In recent years, the number of patients with systemic fungal infections requiring antifungal therapy has increased. As a consequence, antimicrobial resistance to conventional treatment is frequently reported. Because of that, new therapies emerge, including the combination of beta (1-3) glucan and itraconazole. However, the reproductive and fertility effects of this association were not known. So, the aim of this study was to identify the effects of the combination of itraconazole and beta (1-3) glucan, extracted from Saccharomyces cerevisiae, on male rats fertility.

Materials, Methods & Results: The experimental protocol was approved by Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Rio Grande do Sul (protocol CEUA/UFRGS no 19452/2010). Sixty male Wistar rats with 120-days-old were used. The animals were placed into six groups (n = 10 animals / group) as following: Negative Control group - treated daily with the volume corresponding to 10 $mL.kg^{-1}$ of sterile distilled water orally and 0.25 mL of sterile normal saline (NaCl 0.9 %) subcutaneously weekly; Itraconazole (IT) group - treated daily with itraconazole solution at a dose of 10 $mg.kg^{-1}$ orally and 0.25 mL of sterile 0.9% NaCl subcutaneously weekly, Beta group - treated daily the volume corresponding to 10 $mL.kg^{-1}$ of sterile distilled water orally and 0.5 mg of beta (1-3) glucan subcutaneously weekly, Therapeutic Dose (TD) group - daily treated with itraconazole at a dose of 10 $mg.kg^{-1}$ orally and 0.5 mg of β (1-3) glucan subcutaneously weekly; TD5x - treated daily with itraconazole at a dose of 50 $mg.kg^{-1}$ orally and 0.5 mg of beta (1-3) glucan subcutaneously weekly; TD10x - daily treated with itraconazole at a dose of 100 $mg.kg^{-1}$ orally and 0.5 mg of beta (1-3) glucan subcutaneously weekly. The rats were treated for 91 consecutive days. Individual body mass, organs relative mass and histopathology,

number of sperm in the cauda epididymis, daily spermatozoal production, sperm parameters, sperm morphology, serum testosterone concentration and reproductive rates were evaluated. Significant differences were observed in daily spermatozoal production, sperm morphology, serum concentration of testosterone, mating rate and birth rate, with lower results in the TD5x and TD10x groups.

Discussion: The systemic toxicity indicators, as body mass variation, water intake and clinical signs, as well as organ histology suggest that systemic toxicity in these animals did not occur. The decrease in serum testosterone concentrations in elevated doses of itraconazole associated with beta (1-3) glucan must be involved in decrease of sperm parameters and in sexual behavior and consequently, in the reproductive rates. Changes in sperm morphology, mainly found in sperm head, indicate sperm immaturity, preamature spermiation, abnormal or degenerate acrosome. Based on these results, it is concluded that beta (1-3) glucan and itraconazole did not affect the male rats reproductive variables when used in therapeutic doses alone or in combination, however these variables were altered with higher doses of itraconazole in the association. These data, added to the absence of histopathological damage of the testes suggest functional effect on male fertility. Caution is advised in the use of high doses of itraconazole with or without beta (1-3) glucan in males, especially in prolonged therapy.

Keywords: reproductive toxicity, antifungal, azoles, immunomodulator, ß-1,3-D-glucopyranose, drug interactions.

Descritores: toxicidade reprodutiva, antifúngicos, azoles, imunomodulator, ß-1,3-D-glucopiranose, interações farmacológicas.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observou-se aumento do número de pacientes com risco de infecções fúngicas sistêmicas, tais como portadores de HIV, distúrbios hematológicos graves ou imunossuprimidos, pacientes oncológicos e receptores de transplantes [22,29]. Tais pacientes necessitam de antifúngicos tanto na forma terapêutica como preventiva [3]. Em contrapartida a estes usos, tornaram-se frequentes os relatos de resistência aos fármacos mais utilizados, incluindo o itraconazol. Esta resistência é bastante relevante nos casos envolvendo o gênero *Candida*, e descrita com outros agentes, como *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus*, em humanos e animais [9,18,21]. Nos casos de resistências aos antifúngicos tradicionais, novas alternativas terapêuticas foram buscadas; dentre essas, a associação de ß-glucana, estimulante do sistema imunológico, a antifúngicos tradicionais, mostram-se promissora [2,12,19]. Contudo, não existem estudos sobre os efeitos dessa associação sobre o sistema reprodutivo.

O itraconazol, como os demais triazoles, apresenta amplo espectro de ação com efeitos tóxicos reduzidos, se comparado aos antifúngicos mais antigos [8]. Porém, os azoles, incluindo triazoles, possuem interação com várias classes de fármacos [32]. Esta possibilidade de interações entre diferentes compostos é motivo de preocupação, devido ao risco de efeitos adversos sinérgicos, destacando-se a potencial toxicidade reprodutiva das substâncias administradas isoladamente ou em associação [4]. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi identificar os efeitos da associação de itraconazol e β (1-3) glucana, extraída do *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a fertilidade em ratos machos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 240 ratos Wistar, 60 machos (120 dias de idade) e 180 fêmeas (90 dias de idade), com padrão sanitário convencional, oriundos do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde com período de claro/escuro constante de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e a umidade relativa do ar controlada. Foram alojados em caixas de polipropileno com dimensão de 40x33x16,5 cm forradas com maravalha, trocada três vezes por semana. Os ratos foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*, e passaram por uma semana de adaptação antes do início do experimento.

O alojamento, manejo e eutanásia seguiram os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Fármacos e preparação das soluções de tratamento

A solução de itraconazol foi obtida através da maceração e diluição em água destilada estéril do conteúdo da apresentação comercial de itraconazol[1] e preparada diariamente. A concentração correspondeu à dose por quilograma de massa corporal referente a cada grupo diluída em volume de dez mililitros. A solução de administração foi homogeneizada antes do início dos tratamentos. Foi utilizada a apresentação comercial injetável de β (1-3) glucana[2]. Esta apresentação possui concentração de 2,0 $mg.mL^{-1}$.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n=10 machos e 30 fêmeas por grupo): **Controle Negativo –** tratado diariamente com o volume correspondente a 10 $mL.kg^{-1}$ de água destilada estéril por via oral e 0,25 mL solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente por via SC; **IT -** tratado diariamente com itraconazol na dose de 10 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,25 mL solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente por via SC; **Beta-** tratado diariamente com o volume correspondente a 10 $mL.kg^{-1}$de água destilada estéril por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT –** tratado diariamente com itraconazol na dose de 10 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT5x -** tratado diariamente com itraconazol na dose de 50 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT10x** – tratado diariamente com itraconazol na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC.

Administrou-se volume idêntico em todos os grupos, sendo definido 10 $mL.kg^{1}$ por via oral e 0,25 mL por via SC. A administração via oral foi realizada através de sonda orogástrica flexível. Os machos foram tratados durante 91 dias consecutivos (70 dias antes do acasalamento e 21 dias durante o período de acasalamento). Nas fêmeas foi iniciado o tratamento 14 dias antes do acasalamento e prosseguido durante o período de acasalamento (máximo de 21 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Mensurou-se diariamente a massa corporal e consumo de água e ração dos animais.

Acasalamento e Avaliação da fertilidade

O acasalamento foi realizado na proporção de um macho para cada três fêmeas durante duas horas por dia (das 6h ás 8h). Após esse período, avaliou-se a presença de espermatozoides (sptz) nos lavados vaginais. O acasalamento ocorreu em um período de

21 dias, correspondendo a três ciclos de cinco dias consecutivos e intervalo de dois dias entre os ciclos.

A partir dos resultados obtidos durante o período de acasalamento, foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas: Taxa de acasalamento: (n° de fêmeas com sptz no esfregaço vaginal/ n° de fêmeas acasaladas) x 100; Taxa de gestação: (n° de fêmeas prenhes/ n° de fêmeas com sptz no esfregaço vaginal) x 100; Taxa de natalidade: (n° de filhotes nascidos vivos/ n° de filhotes nascidos) x 100.

Dosagem de Testosterona

Após os 91 dias de tratamento, os machos foram anestesiados com tiopental sódico (50 $mg.kg^{-1}$) por via intraperitoneal e citrato de fentanila (0,025 $mg.kg^{-1}$) por via SC. Quando alcançado o estado de anestesia, amostras sanguíneas foram obtidas a partir de venopunção da veia cava caudal sob visualização direta. O sangue foi acondicionado em tubos siliconizados sem anticoagulante. Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 1200 *g*, para obtenção de soro, sendo o mesmo acondicionado em microtubo e mantido a -20ºC. A determinação da concentração sérica de testosterona foi realizada através da quimiluminescência utilizando *kit* comercial em aparelho automático[3]. Após a coleta de sangue, a eutanásia foi realizada com sobredose de tiopental sódico, administrado via intravenosa (veia cava caudal).

Avaliação dos órgãos

Rins, adrenais, fígado, baço, linfonodos submandibulares, coração, pulmões, estômago e bexiga foram removidos e avaliados em relação a possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa

corporal do indivíduo. Os órgãos foram conservados em formol tamponado a 10% e submetidos à avaliação histopatológica.

Os órgãos sexuais (testículos, epidídimos, próstata, e vesícula seminal) também foram removidos e sua massa mensurada e relacionada com a massa corporal. Esvaziou-se o conteúdo da vesícula seminal para pesagem. Quatro testículos de cada grupo, selecionados aleatoriamente (dois testículos direitos e dois esquerdos obtidos de diferentes animais), foram fixados em solução de Bouin e submetidos à avaliação histopatológica.

Avaliação dos parâmetros espermáticos

Após a remoção da túnica albugínea, os testículos não fixados foram triturados e homogeneizados em 10 mL de solução de NaCl 0,9% contendo 0,05% de Triton X-100, em homogeneizador tecidual[4] na velocidade de 600 rpm, durante 1 minuto. Cem microlitros do macerado homogeneizado de cada testículo foi diluída em 900 μL de solução de NaCl 0,9%. A cauda de cada um dos epidídimos foi triturada, homogeneizada e diluída de forma semelhante ao realizado com os testículos.

Realizou-se a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, com aumento de 40 vezes, do número total de sptz da cauda do epidídimo e do número de espermátides resistentes (estágios 17-19) do testículo. Na câmara, contou-se a área referente ao volume de 0,1 mm^3.

Para avaliação morfológica dos sptz, um ducto deferente de cada animal foi lavado com 1 mL de solução de NaCl 0,9%, obtendo uma suspensão de sptz. Uma gota da suspensão foi misturada a uma gota de eosina 2% para preparação do esfregaço em lâmina. Avaliou-se 200 sptz por animal em microscópio óptico (400x) para

determinação do percentual de defeitos de cabeça e/ou cauda espermática, classificados de acordo com *Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document* [14].

Análise estatística

Para avaliar a distribuição simétrica das variáveis quantitativas utilizou-se o teste de D'Agostino, sendo então comparadas através da análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis. Quando necessário, as variáveis quantitativas foram analisadas através do Teste de Bonferroni ou Student-Newman-Keuls. Os dados com distribuição simétrica foram apresentados como média ± erro padrão médio (epm) e os com distribuição assimétrica como mediana ± intervalo interquartílico. As variáveis qualitativas referentes às taxas reprodutivas calculadas e ao percentual de alterações morfológicas nos sptz foram calculadas através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Considerou-se estatisticamente significativo uma confiança de 95% (P = 0,05). Estes dados foram processados no programa BioEstat 5.3.

RESULTADOS

Variação da massa corporal e consumos

O ganho de massa corporal (aos 91 dias) em relação à massa corporal inicial (100%) foi de 108,4% (Controle), 110,5% (IT), 112,7% (Beta), 112,9% (DT), 107,6% (DT5x) e 107,8% (DT10x), não havendo diferença estatística entre os grupos (P = 0,2703). As médias diárias de consumos de ração em relação à massa corporal (g de ração/100 g de massa corporal) e de água (mL de água/100 g de massa corporal) durante os 70 dias de tratamento pré-acasalamento não apresentaram diferença estatística entre os grupos (P=0,363 e P=0,229, respectivamente).

Massa Relativa dos Órgãos e Avaliação Histológica

Nos órgãos estudados, não foram observadas alterações histopatológicas relevantes nem diferença estatisticamente significativa entre os grupos na sua massa relativa.

Parâmetros espermáticos e dosagem de testosterona

A Tabela 1 apresenta os parâmetros espermáticos (número total de sptz na cauda do epidídimo, produção espermática diária, defeitos espermáticos totais, defeitos espermáticos da cabeça e defeito espermático de cauda) e concentração sérica de testosterona dos machos tratados durante 91 dias consecutivos. Identificou-se diferença estatisticamente significativa na produção espermática diária, nos defeitos espermáticos total, nos defeitos espermáticos da cabeça e na concentração sérica de testosterona, mostrando alterações com doses crescentes de itraconazol na associação com ß-glucana. O número total de sptz na cauda do epidídimo apresentou tendência de redução de sptz à medida que a dose de itraconazol aumenta, com nível de significância próximo ao determinado (P = 0,058).

Taxas reprodutivas

A tabela 2 apresenta as taxas reprodutivas calculadas dos ratos. Observou-se diferença estatisticamente significativa na taxa de acasalamento e de natalidade.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para identificar interferências da associação de ß-glucana e itraconazol sobre a fertilidade, parâmetros espermáticos e concentração de testosterona em ratos. Os indicadores de toxicidade sistêmica, como a variação da massa corporal, o consumo de água e ração e o acompanhamento dos sinais clínicos [5,24],

assim como a histologia dos órgãos sugerem que não houve toxicidade sistêmica nos animais tratados no presente trabalho. Resultados semelhantes foram observados em estudos que avaliaram os fármacos isoladamente; ratos tratados com doses elevadas de itraconazol (100 $mg.kg^{-1}$) por via oral, durante 30 dias, não apresentaram alterações no hemograma, nas enzimas hepáticas e/ou no histopatológico [21]; ratos tratados com lentinan, uma ß-glucana extraída do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*), não apresentaram sinais de toxicidade grave em doses até 2500 $mg.kg^{-1}$ [23], assim como ratos tratados com ß-glucana extraída de *Ganoderma lucidum*, na dose de 2000 $mg.kg^{-1}$ [7].

Em doses consideradas terapêuticas, a ß-glucana (0,5 $mg.kg^{-1}$) e o itraconazol (10 $mg.kg^{-1}$) associados ou de forma isolada não apresentaram sinais de toxicidade reprodutiva. Porém, a elevação da dose de itraconazol na associação demonstrou interferências nos parâmetros reprodutivos (produção de sptz, morfologia espermática, concentração de testosterona sérica e taxas reprodutivas).

Os azoles podem potencialmente agir no citocromo P450 dos mamíferos, interferindo na síntese de esteroides, causando inibição da biossíntese de estrógenos e andrógenos. Alguns azoles também mostraram ação nos receptores de estrógenos e andrógenos, inibindo-os [16]. No presente estudo, observou-se diminuição da concentração sérica de testosterona relacionada às doses mais elevadas de itraconazol na associação com ß-glucana, indicando ação inibitória da síntese de testosterona, agindo como disruptor endócrino.

A ruptura da homeostase da testosterona parece estar envolvida na toxicidade reprodutiva dos antifúngicos. Alguns antifúngicos azólicos já testados, tais como cetoconazol, econazol, miconazol e fluconazol diminuem os níveis de testosterona [11,16]. O fluconazol em coelhos provocou diminuição do volume seminal, da

contagem e da motilidade espermática [11]. A diminuição da fertilidade também foi observada em camundongos tratados com cetoconazol, com declínio da motilidade e densidade espermática [15]. A diminuição da produção espermática pode estar relacionada à diminuição da concentração sérica de testosterona, visto que andrógenos e gonadotrofinas exercem papel essencial na espermatogênese e no funcionamento do sistema reprodutivo masculino [31]. Da mesma forma, no presente trabalho, doses elevadas de itraconazol na associação com ß-glucana diminuíram os parâmetros espermáticos, decorrentes possivelmente da diminuição da concentração de testosterona. Deve ser evidenciado que nem todos os azoles cursam com inibição da síntese de andrógenos, pois altas doses de alguns triazoles, tais como miclobutanil, propiconazol, triadimefon, foram relacionadas com aumento da testosterona sérica e do peso dos testículos em ratos [13].

A concentração de testosterona sérica e os receptores de estrógenos também possuem relevante papel sobre o comportamento sexual em camundongos machos [25]. No presente estudo, a taxa de acasalamento foi menor nos animais submetidos a doses mais elevadas de itraconazol na associação, possivelmente como consequência da diminuição na concentração de testosterona. Outros mecanismos podem também estar envolvidos, visto que alguns azoles podem, além de diminuir a síntese de testosterona, inibir os receptores de estrógenos e andrógenos [16]. A ocorrência de impotência e diminuição da libido com o uso de itraconazol foi relatada em humanos, sem, no entanto, diminuição dos níveis de testosterona [1].

As alterações na morfologia espermática, geralmente, são decorrentes de um dos três mecanismos: fisiológico, citotóxico ou genético [10]. No presente estudo observou-se aumento no percentual de defeitos na morfologia espermática, principalmente relacionados a defeitos de cabeça dos sptz, nos animais que receberam doses mais

elevadas de itraconazol na associação. Estes achados evidenciam danos biologicamente relevantes decorrentes da ação deste fármaco, considerando principalmente que as alterações observadas na cabeça dos sptz podem indicar imaturidade dos sptz, espermiação prematura, acrossomo anormal e/ou degeneração do acrossomo. Pondera-se que as mudanças causadas nos parâmetros espermáticos por ação dos fármacos podem ser mais facilmente detectadas em ratos do que em homens [28].

Foi descrito que a ß-glucana possui as capacidades antimutagênica, anti-inflamatório, desmutagênica [17,26,27], de proteção miocárdica após lesão de isquemia/reperfusão, protetora gástrica em lesões induzidas por irritantes, além de auxiliar na cicatrização de feridas e úlceras [6,30]. Contudo, no presente estudo não foi possível determinar o potencial protetivo da ß-glucana, não sendo evidente sua participação nos achados. Os efeitos reprodutivos foram atribuídos ao itraconazol. As mudanças encontradas na concentração sérica de testosterona, nos parâmetros espermáticos e nos índices reprodutivos sem, no entanto, mudanças histopatológicas significativas dos órgãos reprodutivos, sugerem que o itraconazol em doses elevadas induza alterações funcionais da fertilidade masculina, semelhantemente ao que ocorre com o fluconazol [11].

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que a ß-glucana e o itraconazol não interferiram nas variáveis reprodutivas avaliadas de ratos machos quando utilizados em doses terapêuticas, isoladamente ou em associação, contudo demonstram alterar tais variáveis frente às doses mais elevadas de itraconazol na associação. Estes dados, somados à ausência de lesão histopatológica dos testículos, sugerem efeito funcional sobre a fertilidade dos machos. Recomenda-se precaução na utilização de altas doses de

itraconazol associado ou não a ß-glucana em machos, principalmente em terapias prolongadas.

SOURCES AND MANUFACTURERS

[1] Itraconazol Genérico- Prati-Donaduzzi, Toledo, PR, Brasil (Lotes:09F325 e 11I07R).

[2] Imunoglucan - Laboratório Hebron Farmacêutica, Caruaru, PE, Brasil (Lote: PE49647).

[3] Immulite 1000 – Siemens AG, Erlangen, Germany.

[4] Fisatom 720 - Fisatom, São Paulo, SP, Brasil.

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ethical Approval: Aprovado pela CEUA/UFRGS (protocolo nº 19452/2010).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. **Amichai B. & Grunwald M.H. 1998.** Adverse drug reactions of the new oral antifungal agents – terbinafine, fluconazole, and itraconazole. *International Journal of Dermatology*. 37(6): 410–415.

2. **Azevedo C.M.P.S., Marques S.G., Resende M.A., Gonçalves A.G., Santos D.V.C.L., Silva R.R., Sousa M.G.T. & Almeida S.R. 2008.** The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. *Mycoses*. 51(4):341–344.

3. **Boogaerts M. & Maertens J. 2001.** Clinical experience with itraconazole in systemic fungal infections. *Drugs*. 61(suppl 1): 39-47.

4. **Cantarutti T.F.P. 2005.** Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar. 60f. Curitiba, PR. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná.

5. **Chapin R.E., Gulati D.K., Barnes L.H. & Teague J.L. 1993.** The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Fundamental and Applied Toxicology*. 20(1):23-29.

6. **Chaung H.C., Huang T.C., Yu J.H., Wu M.L. & Chung W.B. 2009.** Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 131(3-4): 147-157.

7. **Chen S.N., Nan F.H., Chen S., Wu J.F., Lu C.L. & Soni M.G. 2011**. Safety assessment of mushroom β-glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology*. 49(11): 2890–2898.

8. **Costa E.O. & Górniak S.L. 1996.** Agentes antifúngicos e antivirais, In: Spinosa H.S., Górniak S.L. & Bernardi M.M. (Eds) *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.375-386.

9. **Dalazen D., Zanrosso D., Wanderley L., Silva N.L. & Fuentefria A.M. 2011.** Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de Candida spp. Orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 47(1): 33-38.

10. **Ekaluo U.B., Ikpeme E.V. & Udokpoh A.E. 2009.** Sperm head abnormality and mutagenic effects of aspirin, paracetamol and caffeine containing analgesics in

rats. *The Internet Journal of Toxicology*. 7(1). [Fonte: http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-toxicology/volume-7-number-1/sperm-head-abnormality-and-mutagenic-86+effects-of-aspirin-paracetamol-and-caffeine-containing-analgesics-in-rats.html#sthash.e0v62hJS.dpbs].

11. **El-Medany A.H. & Hagar H.H. 2002.** Effect of fluconazole on the fertility of male rabbits. *Arzneimittelforschung*. 52(8): 636-640.
12. **Faria R.O. 2010**. Associação da Beta (1-3) glucana e fluconazol no tratamento da criptococose experimental. 68f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterináiras) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
13. **Goetz A.K., Ren H., Schmid J.E. 2007.** Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicological Sciences*. 95(1): 227–239.
14. **IRDG 2000**. *Rat Sperm Morphological Assessment Guideline Document*, 15p. Disponível em: <http://www.irdg.co.uk/Sperm_morphology.pdf>. Acessado em 08/2013.
15. **Joshi S.C., Jain G.C. & Lata, M. 1994.** Effects of ketoconazole (an imidazole antifugal agent) on the fertility and reproductive function of male mice. *Acta Europaea Fertilitatis*. 25(1): 55-58.
16. **Kjærstad M.B., Taxvig C., Nellemann C., Vinggaard A.M. & Andersen H.R. 2010.** Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*. 30(4): 573-582.

17. **Magnani M. & Castro-Gómez R.J.H. 2008.** β -glucana de Saccharomyces cerevisiae: constituição, bioatividade e obtenção. *Semina: Ciências Agrárias*. 29(3): 631-650.

18. **Manavathu E.K., Cutright J.L., Loebenberg D. & Chandrasekar P.H. 2000.** A comparative study of the in vitro susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of Aspergillus spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(2): 229-234.

19. **Martins A.A**. **2012.** Esporotricose sistêmica experimental: avaliação "in vivo" da beta(1-3)-glucana em associação ao itraconazol em modelo murino. 118f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

20. **Meinerz A.R.M. 2007.** Avaliação da atividade in vivo e in vitro da terbinafina e itraconazol frente ao sporotrix schenckii. 72f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

21. **Meinerz A.R.M., Cleff M.B., Nascente P.S., Nobre M.O., Schuch L.F.D., Antunes T.A., Xavier M.O., Meireles M.C.A. & Mello, J.R.B. 2007.** Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 43(1): 105-109.

22. **Meis J.F.G.M. & Verweij P.E. 2001.** Current Management of Fungal Infections. *Drugs*. 61 (suppl 1):13-25.

23. **Moriyuki H. & Ichimura M. 1980.** Acute toxicity of lentinan in mice and rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* 5(suppl 1):1-9.

24. **OECD 2011.** Guideline for the testing of chemicals. *Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, n.443,* 25p. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1378682090&id=id&accname=guest&checksum=6328A2B4F8C52D0FB9C726DCBFEB71BE>. Acessado em 08/2013.

25. **Ogawa S., Washburn T.F., Taylor J., Lubahn D.B., Korach K.S. & Pfaff D.W. 1998.** Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology*. 139(12): 5058-5069.

26. **Oliveira R.J., Matuo R., Silva, A.F., Matiazi H.J., Montovani M.S. & Ribeiro L.R. 2007.** Protective effect of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in Vitro*. 21(1): 41-52.

27. **Oliveira R.J., Ribeiro L.R., Silva A.F., Matuo R. & Mantovani M.S. 2006.** Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of beta-glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology in Vitro*. 20(7): 1225-1233.

28. **Perreault S.D. & Cancel, A.M. 2001**. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction*. 121(2): 207–216.

29. **Rüping M.J.G.T., Vehreschild J.J. & Cornely O.A. 2008.** Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs*. 68(14): 1941-1962.

30. **Tanaka K., Tanaka Y., Suzuki T. & Mizushima T. 2011.** Protective effect of β-(1,3 → 1,6)-D-glucan against irritant-induced gastric lesions. *British Journal of Nutrition*. 106(4):475-485.

31. **Wanichacheewa S., Singtripop T., Sassa S., Sakamoto S. & Mori T. 2001.** Decrease in the number of sperm associated with decreased blood testosterone levels in male rats treated with extracts from seven plants consumed by natives of northern Thailand. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10(1-2): 1-4.

32. **Zonios D.I., Bennett J.E. 2008.** Update on azole antifungals. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 29(2): 198-210.

Tabela 1 – Parâmetros espermáticos (número total de espermatozoides na cauda do epidídimo, produção espermática diária, defeitos espermáticos total, defeitos espermáticos da cabeça e defeito espermático de cauda) e concentração sérica de testosterona dos machos tratados durante 91 dias consecutivos com itraconazol (IT), β-glucana (Beta), associação de β-glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x, DT10x) e controle negativo. Os valores representam média±epm.

Parâmetro	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	DT10X	P
Número total de espermatozoide ($x10^6$)	286,5 ±29,7	277,6 ±32,8	297,2 ±19,9	231,3 ±17,3	222,3 ±15,8	215,5 ±22,2	0,0580
Produção espermática diária ($x10^6$)	$20,3^{ab}$ ±1,8	$23,4^{a}$ ±1,8	$21,0^{ab}$ ±0,8	$21,1^{ab}$ ±1,2	$17,0^{b}$ ±1,05	$15,7^{b}$ ±0,7	0,0016
Defeitos espermáticos totais (%)	$5,85^{a}$ ±1,0	$4,35^{a}$ ±0,6	$5,15^{a}$ ±0,6	$6,75^{a}$ ±0,8	$7,15^{ab}$ ±0,64	$10,45^{b}$ ±1,1	0,0001
Defeitos espermáticos de cabeça (%)	$1,6^{ab}$ ±0,6	$1,3^{a}$ ±0,4	$1,5^{ab}$ ±0,3	$2,9^{ab}$ ±0,4	$4,2^{bc}$ ±0,5	$6,0^{c}$ ±1,1	<0,0001
Defeitos espermáticos de cauda (%)	4,25 ±0,6	3,05 ±0,5	3,65 ±0,5	3,8 ±0,5	2,95 ±0,5	4,45 ±0,4	0,2726
Concentração sérica de testosterona*	$186,5^{a}$ ±101,7	$230,5^{a}$ ±191,1	$130,5^{ab}$ ±233,5	$260,5^{a}$ ±190,7	$70,95^{bc}$ ±81,4	$63,2^{c}$ ±71,6	0,012

Valores com a mesma letra na linha não apresentam diferença significativa, considerando P<0,05. *Mediana ±Desvio interquartílico.

Tabela 2 - Taxas reprodutivas de ratos tratados com itraconazol (IT), β- glucana **(**Beta**)**, associação de β-glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x, DT10x) e controle negativo.

Índices Reprodutivos	**Controle**	**IT**	**Beta**	**DT**	**DT5X**	**DT10X**	**P**
Machos Acasalados (n)	10	10	10	10	10	10	
Fêmeas Acasaladas (n)	30	30	30	30	30	29[§]	
Taxa de Acasalamento (%)	50[ab]	73.3[a]	53.3[ab]	56.6[a]	26.6[bc]	6.89[c]	<0.0001
Taxa de gestação (%)	86.6	86.36	87.5	82.3	100	100	0.827
Taxa de Natalidade (%)	98.24[a]	99.45[a]	99.31[a]	99.10[a]	83.63[b]	60[b]	<0.0001

Valores com a mesma letra na linha não apresentam diferença estatística significativa, considerando P<0,05. §Uma fêmea morreu de causas não relacionadas ao tratamento.

CAPÍTULO 3

5. ARTIGO 2

Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie

Enviado para publicação:

Pesquisa Veterinária Brasileira

Trabalho

Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie[3]

Rafael Stedile[4]*, Clarissa B. Hollenbach[2], Fernanda B. Mello[5], Fabíola P.S. Mello[2], Rafaela Bing[2], Patrícia P. Rosa[2], Luciana M. Silva[2], Itatiele F. Vivian[2] e João R. B. Mello[6]

ABSTRACT.- Stedile R., Hollenbach C.B., Mello F.B., Mello F.P.S, Bing R., Rosa P.P., Silva L.M., Vivian I.F. &. Mello J.R.B. 2014. [Reproductive toxicity of itraconazole in combination with beta-glucan in female rats and their offspring] Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Rua Fernandes de Barros, 685, Bairro Alto da XV, CEP 80045-390, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: stediler@gmail.com

The effects of itraconazole in combination with β (1-3) glucan (extracted from *S. cerevisiae)* on female rats fertility and the possible interference in the offspring development, including teratogenic potential, were evaluated. One hundred eighty female rats (90 days old) were separated into six groups (n= 30): **IT**- treated daily with 10 mg.kg^{-1} itraconazole via orogastric; **Beta** - treated weekly with 0.5mg of beta-glucan subcutaneously (SC); **DT**, **DT5x** and **DT10x** - treated with a combination of beta-glucan (0.5 mg, SC, weekly) and three different doses of itraconazole, 10, 50 and 100 mg.kg^{-1}, respectively, via orogastric; and **Control** -treated daily with distilled water orally and sterile NaCl 0.9 % (SC, weekly). The rats were treated before (14 days) and during the mating period (up to 21 days), pregnancy and lactation (21 days). The reproductive index of females, including maternal behavior; fetal skeletal changes; and indicators of physical and neuromotor development in the offspring, including open field behavior and sexual behavior, were evaluated. The results of this study showed that high doses of itraconazole in combination with beta-glucan have embryotoxic potential, including teratogenic effects. The embryofetal toxicity is probably also related to beta-glucan, as it showed the same effect when administered alone. Delays in some indicators of physical development indicate effects of higher doses of itraconazole on offspring development. The data demonstrate the potential interference of the drug combination on the fertility of female rats and developing fetuses /pups, so caution is advised in the administration of these drugs alone or combined, during pregnancy, with particular attention to higher doses of itraconazole.

Index Terms: fertility, antifungal, azoles, immunomodulator, ß-1,3-D-glucopyranose, drug interactions, teratogenicity.

RESUMO – Foram estudados os efeitos da associação de itraconazol e β (1-3) glucana, extraída do *S. cerevisiae*, sobre a fertilidade em ratas e as possíveis interferências no desenvolvimento da progênie, incluindo potencial teratogênico. Utilizou-se 180 ratas Wistar (90 dias de idade), separadas em seis diferentes grupos (n=30): **IT**- tratadas com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol por via oro-gástrica (VO) diariamente; **Beta** – tratada com 0,5mg de beta-glucana por via subcutânea (SC) semanalmente; **DT, DT5x e DT10x** – tratadas com associação de beta-glucana (0,5 mg, SC) e três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (VO), respectivamente; e **Controle** – tratadas com água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% (VO). Os animais foram tratados durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Avaliou-se os índices reprodutivos das fêmeas,

[3] Recebido em
Aceito para publicação em
[4] Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. * Autor para correspondência: stediler@gmail.com
[5] Departamento de Ciências Básicas da Saúde,Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Avenida Sarmento Leite, n. 250 – 3º andar, Porto Alegre, RS 90010191 Brasil.
[6] Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Avenida Sarmento Leite 500/200, Porto Alegre, RS 90050-170, Brasil.

incluindo comportamento maternal; as alterações esqueléticas nos fetos; e indicadores de desenvolvimento físico e neurolocomotor na progênie, incluindo comportamento em campo aberto e comportamento sexual. Os resultados do presente estudo demonstraram que doses elevadas de itraconazol na associação com beta-glucana apresentam potencial embriotóxico, incluindo efeitos teratogênicos. A toxicidade embriofetal também está relacionada, possivelmente, à beta-glucana, visto que esta apresentou efeito mesmo quando administrada isoladamente. Atrasos em alguns indicadores de desenvolvimento físico indicam efeitos das doses mais elevadas de itraconazol no desenvolvimento dos filhotes. Os dados demonstram potencial interferência da associação na fertilidade das mães e no desenvolvimento dos fetos/filhotes, assim recomenda-se cautela na administração destes fármacos, associados ou não, na gestação, com atenção especial às doses mais elevadas de itraconazol.

Temos de Indexação: toxicidade reprodutiva, antifúngicos, azólicos, imunomodulator, ß-1,3-D-glucopiranose, interações farmacológicas, fertilidade, teratogenia**.**

INTRODUÇÃO

As infecções durante a gestação são sempre situações difíceis de serem manejadas, pois, neste período, o organismo está sujeito a uma série de mudanças fisiológicas e, consequentemente, na farmacocinética dos medicamentos utilizados (Vallano & Arnau 2009). A escolha de fármacos durante a gestação é sempre problemática, pois estima-se que 2-3% dos neonatos apresentem más-formações congênitas e, dentre estes, 2-5% são decorrentes do consumo de medicamentos (Gimeno et al. 2005).

Embora as mulheres grávidas apresentem susceptibilidade à infecção fúngica semelhante à das não-grávidas, algumas infecções são mais comuns em gestantes, podendo estar associadas a formas sistêmicas, graves e/ou refratárias à terapia (King et al., 1998). Dentre os fármacos antifúngicos mais utilizados encontra-se o itraconazol. Contudo, devido, principalmente, à utilização indiscriminada, os relatos de isolados fúngicos resistentes e casos clínicos refratários ao tratamento vem crescendo (Meinerz et al. 2007, Khosravi 2009, Lelièvre et al 2013). Neste sentido, novas alternativas terapêuticas tem sido desenvolvidas, tais como a associação de beta-glucana, estimulante do sistema imune, a antifúngicos tradicionais, com resultados promissores (Azevedo et al. 2008, Faria 2010, Martins 2012, Garcia et al 2013). Os azóis, que inclui os triazóis, possuem interação com várias classes de fármacos. A interação do itraconazol com outros fármacos vem sendo extensivamente estudada. É importante lembrar que fármacos que não possuem dados indicando a existência de interação, não significam ausência desta (Zonios & Bennett 2008). Com o crescente uso da associação de itraconazol e β-glucana no tratamento de doenças fúngicas em humanos e animais, torna-se necessário maior entendimento da interação entre estes fármacos. Os conhecimentos devem incluir o potencial efeito desta associação sobre a reprodução e ontogênese. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da associação de itraconazol e β (1-3) glucana, extraída do *S. cerevisiae*, sobre a fertilidade em ratas e as possíveis interferências no desenvolvimento da progênie, incluindo o potencial teratogênico.

MATERIAL E METODOS

Animais

Utilizou-se 240 ratos Wistar, sendo 180 fêmeas (90 dias de idade) e 60 machos (120 dias de idade), com padrão sanitário convencional, procedentes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS. Na fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, com ciclo claro das 8:00 às 20:00, temperatura de 22 ± 2 °C e a umidade relativa do ar controlada, submetidos à uma semana de adaptação antes do início dos tratamentos. Foram alojados em caixas de

polipropileno com dimensão de 40x33x16,5 cm forradas com maravalha, trocada três vezes por semana. Os ratos foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

O alojamento, manejo e eutanásia seguiram os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Resolução CFMV nº 1.000, de 11 de maio de 2012. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS (protocolo nº 19452/2010).

Fármacos e preparação das soluções de tratamento

O conteúdo da apresentação comercial de itraconazol[1] foi macerado e diluído em água destilada estéril diariamente, obtendo a suspensão de itraconazol. A concentração da suspensão correspondeu à dose por quilograma de massa corporal, referente a cada grupo, diluída em volume de dez mililitros. A solução foi homogeneizada imediatamente antes dos tratamentos. Foi utilizada a apresentação comercial injetável de β (1-3) glucana[2], a qual possui concentração de 2,0 $mg.mL^{-1}$.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n=30 fêmeas e 10 machos por grupo): **Controle Negativo –** tratado diariamente com o volume correspondente a 10 $mL.kg^{-1}$ de água destilada estéril por via oral e 0,25 mL solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente por via SC; **IT -** tratado diariamente com itraconazol na dose de 10 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,25 mL solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente por via SC; **Beta-** tratado diariamente com o volume correspondente a 10 $mL.kg^{-1}$de água destilada estéril por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT –** tratado diariamente com itraconazol na dose de 10 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT5x** - tratado diariamente com itraconazol na dose de 50 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC; **DT10x** – tratado diariamente com itraconazol na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ por via oral e 0,5 mg de β (1-3) glucana semanalmente por via SC.

Administrou-se volume idêntico em todos os grupos, sendo definido 10 $mL.kg^{-1}$ por via oral e 0,25 mL por via SC. A administração via oral foi realizada através de sonda orogástrica flexível. Iniciou-se o tratamento das fêmeas 14 dias antes do acasalamento, prosseguido pelos períodos de acasalamento (máximo de 21 dias), de gestação (21 dias) e de lactação (21 dias). Os machos foram tratados durante 91 dias consecutivos (70 dias antes do acasalamento e 21 dias durante o período de acasalamento). Mensurou-se diariamente a massa corporal e consumo de água e ração dos animais.

Acasalamento e Avaliação da fertilidade

O acasalamento foi realizado na proporção de um macho para cada três fêmeas durante duas horas do período escuro por dia (das 6h ás 8h). Após esse período, avaliou-se a presença de espermatozoides (sptz) nos lavados vaginais. O acasalamento ocorreu em um período de 21 dias, correspondendo a três ciclos de cinco dias consecutivos e intervalo de dois dias entre os ciclos.

A partir dos resultados obtidos durante o período de acasalamento, foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas: Taxa de acasalamento: (n° de fêmeas com sptz no esfregaço vaginal/ n° de fêmeas acasaladas) x 100; Taxa de gestação: (n° de fêmeas prenhes/ n° de fêmeas com sptz no esfregaço vaginal) x 100; Taxa de parto: (nº de fêmeas paridas a termo/ nº de fêmeas prenhes) x 100; Taxa de natalidade: (n° de filhotes nascidos vivos/ n° de filhotes nascidos) x 100; Taxa de viabilidade: (nº de filhotes vivos até o 4º dia de lactação/ nº de filhotes nascidos vivos) x 100; Taxa de desmame: (n° de filhotes ao desmame/ n° de filhotes nascidos vivos) x 100; Taxa de teratogenia: (nº de filhotes com malformações macroscópicas externas/ nº total de filhotes) x 100; Taxa de perdas pós-implatação: [(nº de sítios de implantação – nº de fetos nascidos)/ nº de sítios de implantação] x 100.

Gestação e Cesariana

As fêmeas foram avaliadas diariamente durante o período de gestação quanto à presença de alterações clínicas. Metade das fêmeas de cada grupo foram submetidas à anestesia com a associação de tiletamina/zolazepan (50 $mg.kg^{-1}$) e citrato de fentanila (0,025 $mg.kg^{-1}$), ambos por via subcutânea no 21º dia de gestação. As ratas foram, então, submetidas à celiotomia. O útero gravídico foi removido e a sua massa mensurada com seu conteúdo. Os fetos foram removidos e

---

[1] Itraconazol Genérico- Prati-Donaduzzi, Toledo, PR, Brasil (Lotes:09F325 e 11I07R).

[2] Imunoglucan - Laboratório Hebron Farmacêutica, Caruaru, PE, Brasil (Lote: PE49647).

enxugados. Observaram-se os fetos em relação à vitalidade, e após os mesmos foram sexados, pesados e avaliados para detecção de alterações macroscópicas externas quanto à presença de más-formação. Os fillhotes foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico por via intraperitoneal (IP), identificados e fixados em formalina 10%. Após a remoção dos botões embrionários, os sítios de implantação uterinos foram avaliados. A eutanásia das ratas foi realizada com sobredose de tiopental sódico por via intravenosa através de punção, sob visualização direta, da veia cava caudal, sendo em seguida, os demais órgãos avaliados macroscopicamente.

Processo de diafanização de fetos e diagnóstico das alterações ósseas

Os fetos provenientes do procedimento de cesariana foram submetidos à técnica de diafanização de Taylor e Van Dike modificada, conforme descrito por Dallegrave (2003). As alterações esqueléticas foram avaliadas em microscópio estereoscópico e classificadas de acordo com o *Atlas of external and skeletal anomalies in rats* (Chahoud 1996).

Lactação e Comportamento Maternal

A outra metade das progenitoras pariram a termo e foram avaliadas quanto ao tempo de gestação e sinais de distocia. Estas fêmeas foram acompanhadas até o 21º de lactação, quando os filhotes foram desmamados.

O comportamento da rata com sua ninhada foi registrado em vídeo durante 30 minutos, nos dias 1, 5 e 10 do pós-parto, pela manhã no período claro (entre 9:00 às 11:00). As gravações foram iniciadas no momento em que a rata era colocada na caixa após o tratamento experimental. Foram avaliados, conforme Stern & Johnson (1990) a latência e os tempos despendidos pelas mães:

- posicionando-se sobre os filhotes, sem, no entanto, estar imóvel (*hovering over);*
- amamentando - em posição arqueada (mãe com o dorso arqueado sobre os filhotes, com as pernas separadas e estendidas, imóvel por no mínimo dois minutos);
- lambendo/limpando os filhotes;
- latência em carregar o primeiro filhote.

Após o término do período de lactação as progenitoras foram submetidas à eutanásia com sobredose de tiopental sódico, IP, com prévia analgesia por citrato de fentanila (0,025 $mg.kg^{-1}$, SC). Rins, adrenais, fígado, baço, linfonodos submandibulares, coração, pulmões, estômago, bexiga, ovário e útero foram removidos e suas massas mensurada. No útero, fez-se a contagem dos implantes uterinos presentes. Os órgãos foram preservados em formol tamponado a 10% e submetidos à avaliação histopatológica.

Desenvolvimento pós-natal da prole

Ao nascimento, os filhotes das fêmeas paridas foram sexados e identificados individualmente com tinta nanquim, via subcutânea, utilizando agulha de insulina ultrafina (31G), nos coxins plantares e palmares. Registrou-se o número de filhotes vivos e mortos de cada ninhada e a presença de alterações anatômicas externas. Padronizaram-se as ninhadas com máximo de oito filhotes cada. Os filhotes extras foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (IP), com prévia analgesia por citrato de fentanila. A massa dos filhotes foi mensurada diariamente de forma coletiva (por ninhada) até o 30º dia pós-natal e de forma individual nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35.

Na avaliação do desenvolvimento físico dos filhotes foi considerado o dia do aparecimento da penugem, descolamento dos pavilhões auriculares (bilateralmente), erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento dos pelos, abertura dos olhos (bilateralmente), descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal. Após o desmame, as ninhadas foram mantidas em caixas coletivas até o 35º dia pós-natal, quando os filhotes foram separados de acordo com o sexo.

A avaliação do desenvolvimento comportamental foi realizada em todos os filhotes no período da manhã (entre 9:00 e 11:00). Observaram-se o reflexo de endireitamento (dias 2, 3, 4 e 5) e o reflexo de geotaxia negativa (dias 7, 8, 9 e 10) e realizou-se o teste de agarrar em barra cilíndrica (dias 14, 15, 16 e 17). O reflexo de endireitamento consistiu em colocar o animal sobre a mesa, em decúbito dorsal e cronometrar o tempo até o posicionamento voluntário em decúbito ventral, com a observação máxima de 1 minuto. No reflexo de geotaxia, o filhote foi colocado em uma rampa de tela com 30º na posição de cefalodeclive, considerando o tempo até o animal girar 180º (cefaloaclive), com observação máxima de 1 minuto. No teste de agarrar, os filhotes foram suspensos pela cauda e encorajados a agarrar-se em uma barra cilíndrica com as mãos, cronometrando-se o tempo de permanência. Foi permitida uma segunda tentativa de agarrar na

barra, caso o animal não a fazia na primeira. O tempo máximo observação da permanência na barra foi de 20 segundos.

Eutanásia e avaliações da prole na puberdade

Um macho e uma fêmea de cada ninhada, selecionados aleatoriamente, foram submetidos à eutanásia a partir do 75º dia, no período da manhã (entre 10:00 e 12:00). A eutanásia foi realizada com tiopental sódico (150 $mg.kg^{-1}$, IP), sendo os animais previamente medicados com citrato de fentanila (0,025 $mg.kg^{-1}$, SC). A eutanásia das fêmeas foi realizada no dia do estro, confirmado por citologia vaginal, e avaliadas de forma semelhante à mãe. As avaliações dos órgãos, da concentração sérica de testosterona e dos parâmetros espermáticos foram realizadas de acordo com o descrito por Stedile et al. (2013).

Teste de comportamento em campo aberto

Aos 75 dias de idade, um macho de cada ninhada foi selecionado aleatoriamente para avaliação do comportamento em campo aberto. O aparato do campo aberto consistiu em uma caixa de madeira de 1 m^2 com paredes de 50 cm de altura, com sua base dividida em 25 quadrados de 20 cm^2 cada. O rato foi colocado delicadamente em um dos cantos, virado para parede da caixa. O comportamento livre do rato foi registrado em vídeo por 5 minutos, para posterior análise. O teste foi realizado pela manhã, no início do ciclo claro (entre 9:00 e 11:00). Avaliou-se:

- locomoção: número de vezes que o animal cruzava de um quadrado para outro (passando com todas as patas);
- frequência (vezes que iniciava um movimento) e o tempo em movimento em segundos (duração);
- duração e frequência de autolimpeza;
- duração e frequência em levantar (ficando sobre as patas traseiras);
- defecação: número de bolos fecais eliminados pelo animal durante a sessão;
- tempo de permanência nos quadrados centrais.

No início e entre os testes, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%, com o objetivo de homogeneizar a condição experimental, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

Comportamento sexual

Quinze casais não consanguíneos, com aproximadamente 100 dias de idade, foram escolhidos dentro de cada um dos grupos para o acasalamento e avaliação do comportamento sexual. Identificou-se por citologia vaginal as fêmeas em estro, as quais foram consideradas aptas para avaliação. O acasalamento ocorreu em uma caixa acrílica com maravalha no período escuro (entre 20:00 e 23:30), sendo utilizada uma lâmpada vermelha para iluminação (15W). O macho foi colocado 10 minutos antes da fêmea para adaptação na caixa limpa para alojamento. A gravação foi iniciada no momento de introdução da fêmea e durou 30 minutos. Durante o acasalamento foram observadas na fêmea a receptividade e a postura (presença de lordose, desvio lateral da cauda e estiramento do pescoço) e no macho o tempo de latência para primeira monta (com ou sem intromissão), latência para a primeira intromissão (observado pelo padrão motor característico, isto é, monta com movimento profundo da pelve e desmonta rápida; e pela limpeza do genital masculino após a monta), latência de ejaculação (considerando-se ejaculação uma monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea, levantar e balançar do tronco pelo macho, seguido de ausência de interesse sexual por período aproximado de 4 minutos), número de intromissões pré-ejaculação e média de intromissões por minuto.

Ao final do acasalamento, foi realizado lavado vaginal. Quando observados sptz, foi considerado o dia 0 da gestação. Na ausência de sptz, o casal foi colocado uma segunda vez em acasalamento no estro seguinte da fêmea. As fêmeas gestantes foram mantidas em caixas individuais. Mensurou-se a massa corporal das fêmeas a cada 7 dias. Os filhotes desta geração também foram avaliados de forma semelhante aos filhotes da geração anterior, avaliando-se até o 30º dia de idade. As eutanásias de ambas as gerações foram semelhantes ao descrito anteriormente para as progenitoras.

Análises estatísticas

Para avaliar a distribuição simétrica das variáveis quantitativas utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, sendo então comparadas através da análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis. Quando necessário, utilizou-se Teste de Tukey ou Dunnett após análise de variância e Student-Newman-Keuls após Kruskal-Wallis. Os dados com distribuição simétrica foram apresentados como

média ± erro padrão médio (epm) e os com distribuição assimétrica como mediana (desvio interquartílico). As variáveis qualitativas foram calculadas através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Considerou-se estatisticamente significativo uma confiança de 95% (P = 0,05). Estes dados foram processados no programa BioEstat 5.3.

RESULTADOS

Variação da massa corporal e consumos das fêmeas

O ganho de massa corporal no período pré-acasalamento de fêmeas (14 dias) em relação à massa corporal inicial (100%) foi de 104,3% (Controle), 104,5% (IT), 103,2% (Beta), 103,6% (DT), 103,1% (DT5x) e 103,1% (DT10x), não havendo diferença estatística significativa entre os grupos (P = 0,5767). As médias diárias de consumos de ração em relação à massa corporal (g de ração/100 g de massa corporal) e de água (mL de água/100 g de massa corporal) durante 14 dias pré-acasalamento não apresentaram diferença estatística entre os grupos (P=0,667 e P=0,932, respectivamente). O ganho de massa corporal na gestação em relação à massa corporal inicial foi de 150% (Controle), 149,7% (IT), 141,1% (Beta), 143,8% (DT), 131,6% (DT5x) e 112,2% (DT10x), com diferença significativa dos grupos DT5x e DT10x em relação ao grupo controle (P < 0,0001). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na massa corporal no final da gestação entre os grupos (P = 0,08) quando descontada a massa do útero gravídico.

Taxas Reprodutivas

Os Quadros 1, 2 e 3 apresentam os índices reprodutivos das ratas em geral, das fêmeas com parto a termo e das fêmeas submetidas à cesariana, respectivamente. Foram identificadas diferenças significativas nas taxas de acasalamento, natalidade e perdas pós-implantação. O número de filhotes por ninhada foi significativamente menor no grupo tratado com a maior dose de itraconazol (DT10x), assim como a massa corporal dos filhotes de mães submetidos à cesariana (Figura 1). A massa do útero gravídico do grupo DT10x apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos (P < 0,0033).

A média±epm de dias de gestação foi de 21,2±0,18 (Controle), 21,1±0,12 (IT), 21,1±0,16 (Beta), 21,4±0,2 (DT) e 22±0,0 (DT5x), sem diferença estatisticamente significativa (P = 0,075) entre eles. As duas fêmeas prenhas do grupo DT10x foram submetidas a cesariana, não havendo, portanto, partos a termo nem filhotes mantidos neste grupo. Não houve diferença estatística na proporção de nascimentos de machos em relação as fêmeas entre os grupos (P = 0,1948).

Massa relativa dos órgãos e histologia (Fêmeas e Prole na Puberdade)

Nos órgãos estudados, não foram observadas alterações histopatológicas relevantes nem diferença estatisticamente significativa entre os grupos na sua massa relativa, tanto nas mães quanto na prole, machos e fêmeas submetidos à eutanásia na puberdade (dados não apresentados).

Alterações esqueléticas dos fetos

O Quadro 4 mostra os defeitos esqueléticos observados nos diferentes grupos. Foi identificada diferença estatística (P < 0,05) na porcentagem de: costelas toracolombares supranumerárias (evidente e vestigial); ossificação incompleta de parietal, interparietal, supraoccipital, estérnebras, coluna cervical e cauda; alargamento de fontanela; centro de ossificação lateral em 7ª vertebra cervical; estérnebras irregulares e ausentes; e centros vertebrais irregulares. Observou-se tendência de aumento das alterações conforme aumento da dose de itraconazol na associação (P=0,03). Também não houve diferença significativa entre os grupos na proporção de ninhadas que apresentaram alterações (P=0,45).

Comportamento Maternal

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados do comportamento maternal, conforme Quadro 5. Não foi possível realizar a análise estatística da latência e o tempo dispendido na amamentação em posição arqueada devido ao baixo número de animais que apresentaram tal característica no período avaliado em todos os grupos.

Desenvolvimento pós-natal da prole

A Figura 2 representa a variação de massa corporal da progênie (ninhada) nascida de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação (21 dias) desde o nascimento (Dia 0 = 100%) até o 30º dia. Não houve fêmeas com parto a termo no

grupo DT10x. O ganho de massa corporal dentro dos grupos experimentais ficou entre 1111 e 1216%, não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos (P = 0,1557).

O Quadro 6 mostra os indicadores, mensurados em dias, do desenvolvimento físico pós-natal dos filhotes. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média de tempo para o aparecimento de pelos, descida testicular e abertura vaginal no grupo. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos indicadores do desenvolvimento neurolocomotores (reflexo de endireitamento, reflexo de geotaxia e teste de agarrar) entre os grupos estudados (Quadro 7).

Teste de Comportamento em Campo Aberto e Comportamento Sexual na prole

Tanto os parâmetros relacionados ao teste de comportamento em campo aberto quanto os relacionados ao comportamento sexual não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Quadros 8 e 9, respectivamente).

Parâmetros espermáticos e concentração sérica de testosterona na puberdade

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativa nos parâmetros espermáticos e na concentração sérica de testosterona nos machos da prole submetidos a eutanásia durante a puberdade (Quadro 10).

DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para avaliar os efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol, em progressivas doses do último, sobre a fertilidade da fêmea e identificar o potencial teratogênico, assim como os efeitos sobre o desenvolvimento da prole. As alterações macroscópicas externas e os defeitos esqueléticos dos fetos foram utilizados na avaliação do potencial teratogênico. Houve aumento da proporção de fetos com alterações esqueléticas quando utilizadas doses mais elevadas de itraconazol (50 e 100 $mg.kg^{-1}$) na associação com a beta-glucana. Más-formações de estérnebras, crânio e coluna vertebral apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratamentos com doses mais elevadas de itraconazol na associação e o grupo controle. É interessante notar que as anormalidades esqueléticas encontradas no presente estudo não correspondem àquelas descritas por Tiboni et al. (2006), que observaram fendas palatinas e defeitos em membros como as mais sensíveis à exposição a altas doses de itraconazol durante a gestação. No presente estudo, não foram observados fetos com fenda patina. Apesar do delineamento experimental não permitir a elucidação do mecanismo, é possível que a beta-glucana tenha papel nesta diferença. O aparecimento de costelas supranumerárias, quando presente em todos os grupos, pode indicar variação da linhagem de ratos (Cristiane et al. 2008). Contudo, observou-se um aumento estatisticamente significativo da frequência destas variações anatômicas nas doses mais elevadas de itraconazol, sendo também indicativo do potencial teratogênico do itraconazol. Nas doses terapêuticas dos fármacos não houve diferença significativa em relação ao grupo controle.

Os mecanismos que levam a teratogenia dos azóis ainda não estão bem esclarecidos. Contudo, existem evidências que os azóis interfiram na homeostase do ácido retinóico embriônico, através da inibição de enzimas ligadas ao citocromo P450, principalmente a CYP26, e que levam a efeitos teratogênicos. (Marotta & Tiboni 2010, Giavini & Menegola 2010). Muitas das funções do retinol (vitamina A) na embriogênese são realizadas pelo metabólito ativo do ácido retinóico, o qual possui papel no controle das expressões de genes específicos durante o desenvolvimento fetal (Ross et al. 2000). O ácido retinóico é gerado nos tecidos fetais, com a utilização do retinol fornecido maternalmente (Manolescu et al. 2010). É possível que ocorra inibição de outras enzimas ligadas ao citocromo P450 no embrião e que interfiram no desenvolvimento dos mesmos (Giavini & Menegola 2010), produzindo diferenças de alterações morfológicas entre os diversos azóis.

Doses elevadas de itraconazol demonstraram afetar a fertilidade das fêmeas, afetando alguns índices reprodutivos, tais como as taxas de acasalamento, natalidade e perdas pós-implantação. É importante lembrar que parte da diminuição da fertilidade das fêmeas pode estar relacionada aos machos submetidos ao mesmo tratamento, e que apresentaram alterações nos seus índices reprodutivos (Stedile et al. 2013). Os efeitos diretos nas fêmeas podem ser decorrentes da ação como desregulador endócrino e/ou ainda o itraconazol poderia agir modificando a composição das células da placenta, semelhante ao descrito para o cetoconazol (Furukawa et al. 2008). A placenta tem papel fundamental no crescimento e no desenvolvimento embriofetal. Em humanos, já foram determinadas alguns aspectos da função da placenta que são considerados críticos para o feto: adequada invasão dos trofoblastos; aumento do fluxo sanguíneo

uteroplacentário durante a gestação; transporte de nutrientes da mãe para o feto, tais como aminoácidos eglicose; e a produção e transferência de hormônios reguladores do crescimento (Murphy et al. 2006). Assim, a potencial interferência dos antifúngicos azóis na morfologia ou na função placentária pode ocasionar alterações no crescimento e no desenvolvimento dos fetos.

Achados como a alta ocorrência de reabsorções e morte fetais, assim como menor massa corporal ao nascer, são indicativos de embriotoxicidade (Cristiane et al. 2008). A taxa de perdas pós-implantação foi significativamente maior nos animais tratados com beta-glucana, tanto isolada como em associação com o itraconazol. O papel da beta-glucana não está totalmente esclarecido, contudo, sabe-se que os sistemas endócrino e imunológico interagem intensivamente durante a implantação e a manutenção da gestação. O aumento da atividade das células NK está associado ao aumento das taxas de reabsorção fetal (Dosiou & Giudice 2005), o que pode explicar os resultados, visto que a beta-glucana pode aumentar a atividade de células NK (Pelizon et al. 2005). Ainda é possível evidenciar que doses elevadas de itraconazol também contribuíram para o aumento da taxa de perdas pós-implantação, relacionado à sua ação como desregulador endócrino em fêmeas. A diferença observada na massa corporal dos filhotes ao nascer, de mães submetidas à cesariana, pode indicar embriotoxidade tanto da beta-glucana como do itraconazol em doses elevadas, apesar de tal diferença não ter sido constatada nos filhotes nascidos a termo. Considerando ainda a taxa de natalidade e número de filhotes por ninhada, fica evidente a embriotoxicidade do itraconazol nas doses de 50 $mg.kg^{-1}$ e 100 $mg.kg^{-1}$. Tanto a embriotoxicidade como a capacidade teratogênica do itraconazol em ratos estão de acordo com as informações fornecidas na bula do produto de referência para os genéricos, que descreve tais efeitos em doses de 40-160 $mg.kg^{-1}$ (Sporonox 2012).

Na avaliação do desenvolvimento da prole utilizou-se a massa corporal ao nascer, o ganho da massa corporal, testes neurolocomotores e indicadores de desenvolvimento físicos pós-natal. Indicadores maternos de toxicidade, tais como variação da massa corporal pré-acasalamento, sinais clínicos e consumo de água e ração pré-acasalamento (Chapin et al. 1993; OECD 2011) foram utilizados na determinação da influência da toxicidade sistêmica da mãe sobre os efeitos nos filhotes, assim como a massa relativa dos órgãos maternos e a análise histopatológica.

Perturbações graves na saúde da mãe, distúrbios na homeostasia e toxicidade maternal podem influenciar negativamente os indicadores reprodutivos e o desenvolvimento embriofetal (Paumgartten 2010). No presente estudo foi observado menor ganho de massa corporal durante a gestação nas ratas do grupo tratado com 10 vezes a dose considerada terapêutica de itraconazol em associação com a beta-glucana, contudo não foi observado diferença no período pré-acasalamento. Esta redução deve estar relacionada à menor massa corporal dos filhotes e ao menor número de filhotes por ninhada, pois não houve diferença no ganho de massa corporal entre os grupos quando excluídos a massa dos úteros (Tyl 2012). Nos grupos não foram evidenciados sinais de toxicidade sistêmica maternal, tais como sinais clínicos, diminuição da massa corporal, diminuição do consumo de água e ração, mortalidade ou alterações em órgãos (Chahoud et al. 1999). Assim sendo, as alterações observadas nos filhotes não devem ser consequências da toxicidade sistêmica das mães.

A interação mãe-filhote é responsável por diversas respostas fisiológicas nos filhotes e, consequentemente, também no desenvolvimento neurocomportamental dos filhotes. Assim, o comportamento maternal tem papel fundamental no desenvolvimento dos filhotes (Azevedo 2005). Por outro lado, o estímulo tátil na região ventral materna por parte dos filhotes é requerida para que a mãe assuma a postura arqueada e imobilidade durante amamentação (Stern & Johnson 1990). A associação de beta-glucana e itraconazol não demonstrou afetar o comportamento maternal, mesmo em doses de itraconazol cinco vezes maiores que as consideradas terapêuticas. É importante considerar que houve baixo número de partos a termo no grupo que foi tratado com 50 $mg.kg^{-1}$ de itraconazol em associação com beta-glucana e ausência de partos no com maior dose de itraconazol. Este fator limita as inferências de alguns dos parâmetros avaliados neste estudo.

A exposição da mãe à dose de 50 $mg.kg^{-1}$ de itraconazol na associação com beta-glucana ocasionou discreto, mas estatisticamente significativo, retardo em alguns indicadores de desenvolvimento físico dos filhotes (aparecimento de pelo, descida do testículo e abertura vaginal), indicando a potencial ação do itraconazol como desregulador endócrino durante o desenvolvimentos dos filhotes. Os valores ficaram dentro do esperado para espécie. Os antifúngicos azólicos podem, potencialmente, interferir na síntese de esteroides, por ação no citocromo P450 dos mamíferos, inibindo a biossíntese de estrógenos e andrógenos. Alguns azóis também demostraram inibição dos receptores andrógenos e estrógenos (Kjærstad et al. 2010). É interessante notar que, apesar do atraso da abertura vaginal e descida dos testículos, não foram

observados lesões órgãos analisados por histopatologia, diferença significativa nos parâmetros espermáticos ou na concentração sérica de testosterona nos filhotes machos na puberdade. Em machos tratados com a mesma associação, foram observados efeitos funcionais sobre a fertilidade, relacionadas principalmente ao desequilíbrio hormonal (Stedile et al. 2013). É possível que as dosagens mais elevadas do itraconazol na associação causem alteração no comportamento sexual nos filhotes, pois este azol agiria como desregulador endócrino durante o desenvolvimento da libido, contudo, devido a ausência de partos a termos na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ e baixo número de nascidos a termo na dose de 50 $mg.kg^{-1}$de itraconazol na associação, não foi possível analisar o desenvolvimento sexual da prole nos grupos citados.

O reflexo de endireitamento, de geotaxia e o teste de agarrar avaliam o desenvolvimento neurolocomotor, sendo o controle da postura dependente de muitos processos biológicos e percepção exterior. Assim, três sistemas periféricos devem estar envolvidos na regulação da postura: vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo (Altman & Sudarshan 1975). Os fármacos associados ou de forma isolada parecem não influenciar o desenvolvimento neurolocomotor da prole. Também investigou-se o desenvolvimento emocional. O campo aberto é um dos testes mais utilizados para avaliação da atividade geral, sendo um modelo de avaliação do comportamento ligado à ansiedade. É interessante lembrar que o campo aberto não mede diretamente o efeito do tratamento na exploração do ambiente, mas avalia o efeito dos fármacos nas reações frente a situações estressantes (Prut & Belzung 2003). A associação de beta-glucana à dose terapêutica, ou à cinco vezes a dose terapêutica, de itraconazol não demonstrou efeitos sobre a ansiedade.

A dose de beta-glucana e itraconazol utilizado em associação nest estudo já demonstrou sua eficácia terapêutica (Martins 2012). A maioria dos efeitos observados pode ser explicada pela ação do itraconazol. Oliveira et al. (2009) relataram que a beta-glucana diminui os efeitos nos fetos da exposição maternal à ciclofosfamida, principalmente relacionados a viabilidade e as perdas pós-implantação. Se houve algum efeito protetivo da beta-glucana no presente estudo, frente às doses elevadas de itraconazol, este não foi completo, não sendo capaz de evitar os efeitos observados na prole. As associações de fármacos podem desenvolver interações tipo inibitória, aditiva ou potencializadora (Assis & Dalsenter 2009). Em doses terapêuticas associação de beta-glucana e itraconazol não demonstrou desenvolver nenhuma destas interações.

Os resultados do presente estudo demonstraram que doses elevadas de itraconazol na associação com beta-glucana apresentam potencial embriotóxico, incluindo efeitos teratogênicos. A toxicidade embriofetal também está relacionada, possivelmente, à beta-glucana, apresentando efeito mesmo quando administrada isoladamente. Atrasos em alguns indicadores de desenvolvimento físico, apesar de discretos, indicam efeitos das doses mais elevadas de itraconazol no desenvolvimento dos filhotes. Os dados demonstram potencial interferência da associação na fertilidade das mães e no desenvolvimento dos fetos/filhotes. Apesar de a associação de itraconazol e beta-glucana parecer segura em doses terapêuticas, recomenda-se cautela na administração destes fármacos, associados ou não, na gestação, com atenção especial as doses mais elevadas de itraconazol.

REFERÊNCIAS

Altman J. & Sudarshan K. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav. 23: 896–920.

Assis H.C.S. & Dalsenter P.R. 2009. Agrotóxicos: Testes toxicológicos pré-clínicos e ecotoxicológicos. Toxicovigilância – Toxicologia Clínica: dados e indicadores selecionados, Rio Grande do Sul – 2008-2009, Porto Alegre, 29-38.

Azevedo C.M.P.S., Marques S.G., Resende M.A., Gonçalves A.G., Santos D.V.C.L., Silva R.R., Sousa M.G.T. & Almeida S.R. 2008. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. Mycoses. 51:341–344.

Azevedo M.S. 2005. Efeitos de intervenção no ambiente neonatal sobre a relação mãe e o comportamento dos ratos na idade adulta. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 85p.

Chahoud I., Ligensa A., Dietzel L. & Faqi A.S. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. Reproductive Toxicology, 13: 375–381.

Chapin R.E., Gulati D.K., Barnes L.H. & Teague J.L. 1993. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. Fundamental and Applied Toxicology. 20:23-29.

Cristiane V., Amaral D.S., Pereira G. & Junior, N. 2008. Ketoconazole and fluconazole-induced embryotoxicity and skeletal anomalies in Wistar rats: a comparative study. Brazilian Archives of Biology and Technology, 51: 1153–1161.

Dallegrave E. 2003. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato- Roundup em ratos Wistar. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 200p.

Dosiou C. & Giudice L.C. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. Endocrine Reviews, 26: 44–62.

Faria R.O. 2010. Associação da Beta (1-3) glucana e fluconazol no tratamento da criptococose experimental. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 68p.

Furukawa S., Hayashi S., Usuda K., Abe M., & Ogawa I. 2008. Histopathological effect of ketoconazole on rat placenta. The Journal of Veterinary Medical Science, 70: 1179–1184.

Garcia N.G., Oliveira D.T., Pereira A.A., Magalhães E.M.S, Hanemann J.A.C. 2013 Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and β-glucan. International Journal of Dermatololgy (Early View DOI: 10.1111/j.1365-4632.2012.05796.x)

Giavini E. & Menegola E. 2010. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? Toxicology Letters. 198: 106–111.

Gimeno F.J., Cabrera J.P., Mérida M.M., Melchor D.E. C., Medall M.D. B. & Pedroche A.S. 2005. Categorías de riesgo de los medicamentos utilizados durante el embarazo : Guía rápida de consulta. Farmacia de Atención Primaria, 3: 49–61.

Khosravi A.R., Shokri H., Tootian Z., Alizadeh M. & Yahyaraeyat R. 2009. Comparative efficacies of Zataria multiflora essential oil and itraconazol against disseminated Candida albicans infection in Balb/C mice. Brazilian Journal of Microbiology, 40, 439–445.

King C.T., Rogers P.D., Cleary J.D. & Chapman S.W. 1998. Antifungal therapy during pregnancy. Clinical infectious Diseases, 27: 1151–1160.

Kjærstad M.B., Taxvig C., Nellemann C., Vinggaard A.M. & Andersen H.R. 2010. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. Reproductive Toxicology, 30: 573-582.

Lelièvre L., Groh M., Angebault C., Maherault A-C., Didier E. & Bougnoux M.-E. 2013. Azole resistant Aspergillus fumigatus: an emerging problem. Médecine et Maladies Infectieuses, 43: 139–45.

Manolescu D.C., El-Kares R., Lakhal-Chaieb L., Montpetit A. & Bhat P.V. 2010. Newborn serum retinoic acid level is associated with variants of genes in the retinol metabolism pathway. Pediatric Research, 67: 598–602.

Marotta F. & Tiboni G.M. 2010. Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 6:461-482.

Martins A.A. 2012. Esporotricose sistêmica experimental: avaliação "in vivo" da beta(1-3)-glucana em associação ao itraconazol em modelo murino. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 118p.

Meinerz A.R.M., Cleff M.B., Nascente P.S., Nobre M.D. O., Schuch L.F.D., Antunes T.D.Á., Xavier M.O., Meireles M.C.A.& Mello J.R.B. 2007. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 43: 105–109.

Murphy V.E., Smith R., Giles W.B. & Clifton V.L. 2006. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. Endocrine Review, 27:141-169.

OECD 2011. Guideline for the testing of chemicals. Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, n.443, 25p. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1378682090&id=id&accname=guest&checksum=6328A2B4F8C52D0FB9C726DCBFEB71BE . Acessado em: set 2013.

Paumgartten F.J.R. 2010 Influence of Maternal Toxicity on the Outcome of Developmental Toxicity Studies, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 73: 944-951.

Pelizon C., Kaneno R., Soares M.V.C., Meira D. & Sartori A. 2005. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from Saccharomyces cerevisiae. Physiological Research, 54: 557–564.

Prut L. & Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. European Journal of Pharmacology. 463: 3–33.

Ross S.A., McCaffery P.J., Drager U.C. & De Luca L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. Physiological Reviews, 80:1021–1054.

Sporanox 2012. Product Information, Janssen Pharmaceutica. 33p. Disponível em: http://www.janssenpharmaceuticalsinc.com/assets/sporanox.pdf . Acessado em: dez 2013

Stedile R., Hollenbach C.B., Mello F. B., Peixoto F.P.S., Bing R., Rosa, P.P., Silva L.M., Vivian I.F. & Mello R.B. 2013. Efeitos da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de ratos Wistar machos. Acta Scientiae Veterinariae, 55: 1167.

Stern J.M. & Johnson S.K. 1990. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. Physiology & Behavior, 47: 993–1011.

Tiboni G.M., Marotta, F., Del Corso A. & Giampietro F. 2006. Defining critical periods for itraconazole-induced cleft palate, limb defects and axial skeletal malformations in the mouse. Toxicology Letters, 167: 8–18.

Tyl R.W. 2012. Commentary on the role of maternal toxicity on developmental toxicity. Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology, 95: 262–266.

Vallano A. & Arnau J.M. 2009. Antimicrobials and pregnancy. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27: 536–542.

Zonios D.I. & Bennett J.E. 2008. Update on azole antifungals. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 29: 198-210.

Figuras

Fig. 1 – Fetos diafanizados de ratas tratadas com associação de β-glucana (0,5 mg) com três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (respectivamente DT, DT5x e DT10x - da esquerda para a direita) e submetidas a cesariana no 21º dia da gestação. Nota-se clara diferença de tamanho entre os filhotes.

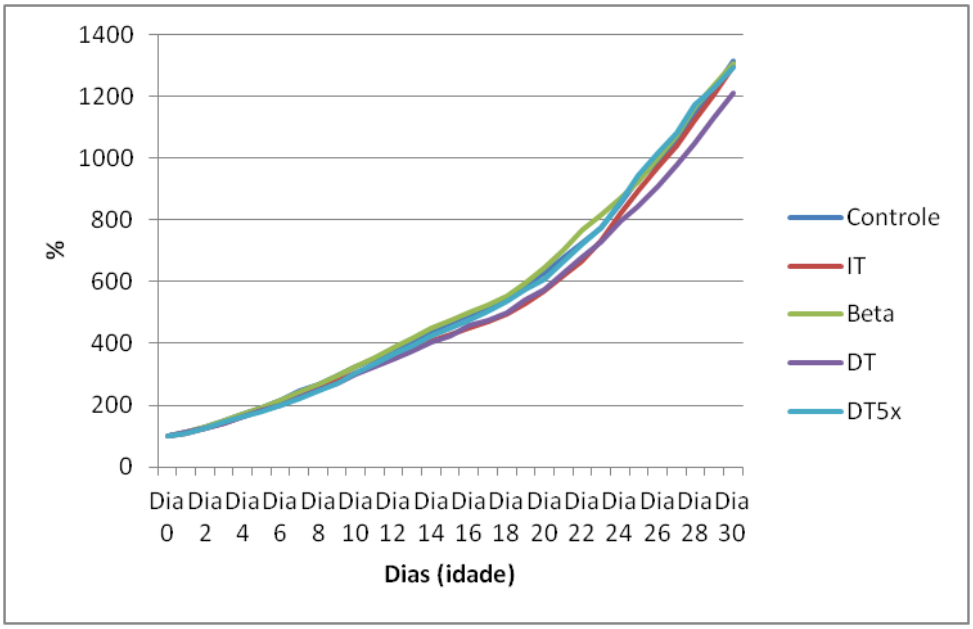

Fig. 2 - Desenvolvimento ponderal da progênie (ninhada) desde o nascimento (Dia 0 = 100%) até 30º dia, nascidos de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias), gestação e lactação (21 dias) com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com duas diferentes doses de itraconazol, sendo 10 e 50 mg.kg^{-1} (respectivamente DT e DT5x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea). Os valores representam a média diária relativa por grupo (Controle=6, IT = 11, Beta = 7, DT = 6, DT5x = 3).

Os Quadros

Quadro 1- Índices reprodutivos de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (respectivamente DT, DT5x, DT10x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Índices Reprodutivos	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	DT10X	p
Fêmeas Acasaladas (n)	30	30	30	30	30	29	
Machos Acasalados (n)	10	10	10	10	10	10	
Fêmeas com esfregaço vaginal positivo (n)	15	22	16	17	8	2	
Fêmeas prenhes (n)	13	20	14	14	8	2	
Filhotes (n)	114	182	145	112	55	5	
Taxa de acasalamento (%)	50^{ab}	73,3^{a}	53,3^{ab}	56,6^{a}	26,6^{bc}	6,89^{c}	<0,0001
Taxa de gestação (%)	86,6	86,36	87,5	82,3	100	100	0,827
Taxa de natalidade (%)	98,24^{a}	99,45^{a}	99,31^{a}	99,10^{a}	83,63^{b}	60^{b}	<0,0001
Taxa de perdas pós-implantação	2,56^{a}	10,34^{b}	9,38^{b}	13,85^{b}	32,10^{c}	73,68^{d}	<0,0001
Filhotes/Ninhada (média±epm)	8,7^{ab} ±1,05	9,1^{ab} ±0,27	10,3^{a} ±0,56	8^{ab} ±1,18	6,8^{ab} ±1,58	2,5^{b} ±0,5	0,0164
Alterações macroscópicas externas nos fetos/fillhotes	1*	Zero	1**	Zero	Zero	Zero	0,729

Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa, * defeito na calota craniana, ** microftalmia.

Quadro 2- Índices reprodutivos de ratas (com parto a termo) tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com duas diferentes doses de itraconazol, sendo 10 e 50 mg.kg^{-1} (respectivamente DT e DT5x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Índices de Fertilidade (fêmeas com parto a termo)	**Controle**	**IT**	**Beta**	**DT**	**DT5X**	**DT10X[1]**	**p**
N (progenitores) filhotes	(8) 64	(11) 101	(7) 72	(7) 54	(4) 28	-	
Filhotes/ninhada	8,00 ±1,67	9,18 ±0,40	10,28 ±0,94	7,71 ±0,85	7,00 ±1,2		0,5264
Massa corporal filhotes (g)	6,25 ±0,09	6,14 ±0,07	6,09 ±0,09	6,4 ±0,09	6,1 ±0,14		0,0758
Taxa de Parto (%)	87,5	100	100	85,71	75		0,4592
Filhotes mantidos[2]	40	86	55	45	22	-	
Taxa de viabilidade (%)	100	95,34	98,18	97,77	90,9		0,3032
Taxa de desmame	100	95,34	98,18	97,77	90,9		0,3032

Não foi observada diferença significativa entre os grupos, [1]Sem partos a termo no grupo, [2] Após padronização das ninhadas em até 8 filhotes

Quadro 3- Índices reprodutivos de ratas (submetidas à cesariana no 21º dia de gestação) tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (respectivamente DT, DT5x, DT10x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Índices de Fertilidade (cesariana)	**Controle**	**IT**	**Beta**	**DT**	**DT5X**	**DT10X[1]**	**p**
N (progenitores) filhotes	(5) 50	(9) 80	(7) 73	(7) 58	(4) 27	(2) 5[1]	
Filhotes/ninhada	10 ±0,70	9 ±0,37	10.42 ±0,68	8.28 ±1,96	6.75 ±2,35	2.5[2] ±0,5	0,0484
Massa corporal filhotes (g)[3]	5,4[a] (0,3)	5,5[a] (0,4)	5,1[b] (0,5)	5,2[b] (0,575)	4,9[c] (0,6)	2,9[c] (0,1)	<0,001
Massa do útero gravídico[4]	72,86[a] ±5,84	68,7[a] ±3,58	77,15[a] ±6,04	73,66[a] ±11,28	66,03[a] ±7,23	13,3 [b] ±9,2	0,0033

Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa, [1] Dois fetos mumificados. Excluídos no cálculo da média da massa corporal dos filhotes e da teratogenia, [2] $p < 0,05$ em relação ao Controle (ANOVA/Dunnet), [3] Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls. Os valores representam mediana (desvio interquartílico). [4] Excluídos úteros sem fetos (apenas com implantes).

Quadro 4 – Defeitos esqueléticos dos fetos de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com três diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (respectivamente DT, DT5x, DT10x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Defeitos esqueléticos	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	DT10X	P
Número de fetos avaliados	50	80	73	58	27	3	
Alterações em costelas							
Costela toracolombar supranumerária vestigial	48,0	55,0	26,0*	51,7	74,1*	100,0*	<0,0001
Costela toracolombar supranumerária evidente	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1*	0,0	0,011
Alterações em crânio e mandíbula							
Incompleta Ossificação de parietal	2,0	3,8	2,7	5,2	18,5*	66,7*	0,018
Incompleta Ossificação de interparietal	0,0	1,3	2,7	6,9	29,6*	100,0*	<0,0001
Incompleta Ossificação do supraocipital	0,0	0,0	1,4	0,0	7,4	66,7*	0,03
Alargamento de fontanela	0,0	5,0	4,1	3,4	14,8*	100,0*	0,0006
Incompleta Ossificação Mandíbula	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	0,0	0,08
Fusão de zigomático	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,74
Fusão de temporal	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,74
Incompleta ossificação incisivo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,08
Incompleta ossificação frontal	0,0	0,0	1,4	0,0	7,4	0,0	0,12
Alterações em esternebra							
Esternebras irregulares	6,0	5,0	17,8	15,5	37,0*	66,7*	0,0006
Incompleta ossificação de estérnebras	0,0	5,0	2,7	5,2	11,1*	100,0*	0,0012
Esternebra ausente	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	100,0*	<0,0001
Alterações em coluna vertebral							
Centro de ossificação lateral em 7ª vértebra cervical	22,0	20,0	13,7	12,1	14,8	100,0*	0,011
Ossificação incompleta coluna cervical (constricão)	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	66,7*	0,0002
Ossificação incompleta coluna cervical (desconectado)	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	66,7*	0,0008
Incompleta ossificação cauda	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7*	0,0012
Centro vertebrais irregulares	0,0	0,0	0,0	0,0	14,8*	66,7*	<0,0001
Ossificação incompleta sacral	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	0,0	0,08
Ausência de vertebra	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	0,43
Alterações em membros							
Ossificação incomplete em tíbia	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,73
Escápula irregular	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	0,0	0,08
Incompleta Ossificação do úmero	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	0,0	0,08
Ossificação imcompleta femur	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	0,0	0,08
Fetos com alterações (%)**	64	79,0	57,5	67,2	100*	100	<0,0001

Valores em porcentagem, * Diferença estatiscamente significativa (p<0,05) em relação ao controle (teste qui quadrado), ** Teste de qui-quadrado tendência (p=0,03)

Quadro 5 – Comportamento maternal nos dias 1, 5 e 10 do pós-parto de fêmeas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com duas diferentes doses de itraconazol, sendo 10 e 50 mg.kg^{-1} (respectivamente DT e DT5x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

	Controle	IT	Beta	DT	DT5x	P
Posicionada sobre os filhotes (*hovering over*):						
***Latência (s)*[1]**	554,1±104,5	424,7±94,1	525,5±83,9	533,9±108,2	530±170	0,892
Tempo (s)	275 (337)	372.5 (288)	249 (298,8)	356 (160)	290 (10)	0,2062
Lambendo:						
Latência (s)	208 (300,8)	266,5 (381,8)	283 (239)	199 (217,8)	136.5 (60,5)	0,5465
Tempo (s)	51.5 (77)	76 (132,8)	69 (73)	92 (49,3)	28.5 (20,5)	0,3993
Latência em carregar o 1º filhote (s)[1]	46 (47)	60 (92,5)	30 (56,5)	44 (41,5)	30 (29)	0,3083

[1] Média±epm/ ANOVA, [2] Os valores representam mediana (desvio interquartílico)/ Kruskal-Wallis.

Quadro 6 - Indicadores do desenvolvimento físico pós-natal de filhotes (valores em dias) de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com duas diferentes doses de itraconazol, sendo 10, 50 e 100 mg.kg^{-1} (respectivamente DT e DT5x) e Controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

	Controle	IT	Beta	DT	DT5x	P
Nº Filhotes avaliados	40	82	54	44	20	
Nº Machos	22	37	25	23	9	
Nº Fêmeas	18	45	29	21	11	
Descolamento das orelhas	2,2±0,07	2,5±0,06	2,4±0,07	2,4±0,07	2,3±0,1	0,063
Aparecimento da penugem	4±0,07	4,1±0,05	4,2±0,08	4,1±0,1	4,3±0,1	0,5734
Início de erupção de incisivos	7,5±0,11	7,4±0,07	7,4±0,08	7,2±0,07	7,3±0,12	0,1457
Aparecimento dos pelos	7,3±0,07	7,3±0,05	7,1±0,05	7,1±0,05	7,8±0,1*	< 0,0001
Abertura dos olhos	13,7±0,12	13,5±0,07	13,8±0,13	13,4±0,12	13,6±0,11	0,0759
Descida dos testículos	15,6±0,16	15,7±0,2	15,4±0,13	15,9±0,17	16,7±0,52*	0,012
Abertura vaginal	34,1±0,5	34,6±0,31	35,6±0,59	33,6±0,52	36,8±0,38*	0,0022
Separação prepucial	36,8±0,26	37,7±0,22	37,7±0,30	37,8±0,40	37,3±0,24	0,1154

Média±epm, * diferença estatisticamente significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle (ANOVA/Dunnet),

Quadro 7 – Reflexo de Endireitamento, Reflexo de Geotaxia positiva e Teste de Agarrar em Barra Cilíndrica em filhotes de ratas tratadas durante o período de pré-acasalamento (14 dias), acasalamento (até 21 dias) e gestação com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β-glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com duas diferentes doses de itraconazol, sendo 10 e 50 mg.kg^{-1} (respectivamente DT eDT5x) e controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

	Controle	IT	Beta	DT	DT5x
Endireitamento					
Dia 2	17.7^{a}	17.8^{a}	16.4^{a}	12.1^{a}	20.2
Dia 3	12.1^{a,b}	13.5^{a,b}	9.4^{a,b}	8.3^{a}	12.6
Dia 4	7.6^{b}	9.1 ^{b,c}	9.8^{a,b}	3.0^{b}	7.7
Dia 5	6.7^{b}	5.3 ^{c}	4.0^{b}	1.8 ^{b}	9.0
Geotaxia					
Dia 7	26,5^{a}	25,5^{a}	23,1^{a}	20,0^{a}	21,7^{a}
Dia 8	18,7^{b}	18,2^{b}	14,1^{b}	17,1^{a}	16,0^{a,b}
Dia 9	15,9^{b}	14,1^{b,c}	12,4^{b}	11,1^{b}	11,5^{b}
Dia 10	9,5^{c}	11,6^{c}	9,4^{b}	9,5^{b}	10,0^{b}
Agarrar					
Dia 14	10,8^{a}	9,2^{a}	7,4^{a}	10,1^{a}	9,0^{a}
Dia 15	13,2^{a}	12,2^{b}	9,9^{a,b}	10,4^{a,b}	11,6^{a,b}
Dia 16	12,8^{a}	13,0^{b}	10,7^{b,c}	13,0^{b,c}	10,0^{a}
Dia 17	14,1^{a}	13,3^{b}	13,0^{c}	15,2^{c}	15,9^{b}

Valores em segundos. Não houve diferença entre os grupos (entre as colunas) em cada parâmetro avaliado. Valores com a mesma letra na coluna (dentro do grupo) não apresentam diferença estatística significativa em cada parâmetro avaliado.

Quadro 8 – Comportamento sexual da prole de ratos e ratas tratados com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) e itraconazol 10mg.kg^{-1} (DT) e Controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Parâmetros	Controle	IT	Beta	DT	p
Latência de monta (s)	37,6±11.5	48,6±13.2	52,4±22.7	64,4±17.1	0,7151
Latência de intromissões (s)*	18(34)	28(43,75)	25(47,5)	51(92,25)	0,3454
Latência de ejaculação(s)	262±110,3	322±77,5	354,2±80,5	300±113,1	0,3534
Nº de intromissões/minuto	1,27±0,19	1,02±0,14	1,31±0,17	0,91±0,18	0,2956
Intromissões até a ejaculação	37,3±6,2	29,01±3,5	36,9±3,9	24,7±4,1	0,2716

Os valores representam média±epm/ANOVA,* Os valores representam mediana (desvio interquartílico)/ Kruskal-Wallis.

Quadro 9 – Comportamento no teste de Campo Aberto da prole de ratos e ratas tratados com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) e itraconazol 10mg.kg^{-1} (DT) e Controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

	Controle	IT	Beta	DT	DT5x	P
Tempo nos Quadrados Centrais (s)	7,7±2,5	7,1±1,8	13,7±4,7	8,7±3,1	15,3±5,9	0,3854
Locomoção	75,5±8,9	70±11,1	96,1±13,4	76,8±7,7	105±11	0,2596
Movimento:						
Frequência	26,2±1,4	21,9±2,6	28,1±3,6	22,8±1,7	30±3,2	0.291
Duração(s)	81,1±4,8	72,8±9,5	74,8±10,2	60±4,5	90±5,1	0.3652
Autolimpeza						
Frequência	6,5±0,8	9,5±1,3	5±0,8	6,8±1,2	8,6±0,9	0,0536
Duração(s)	12,3±1,6	21,8±4	15,4±3,8	21,5±5,9	18±6,8	0,5172
Levantar:						
Frequência	23,8±4,3	19,1±2,5	26,1±3,2	24±2,7	30,3±2,4	0,2536
Duração(s)	39,1±6,2	30,8±4	37,5±6	40,8±6,5	59,6±5,7	0,0753
Defecação (número de bolos fecais)	3,6±1,1	3,2±0,9	3±0,7	4,8±1,1	2±1	0,5379

Os valores representam média±epm (ANOVA)

Quadro 10 - Parâmetros espermáticos (número total de espermatozoides na cauda do epidídimo, produção espermática diária e defeitos espermáticos total) e concentração sérica de testosterona na puberdade de machos filhos de ratos e ratas tratados com 10 mg.kg^{-1} de itraconazol (IT), 0,5 mg de β- glucana (Beta), associação de β-glucana (0,5 mg) com três diferentes doses de itraconazol, sendo 10 e 50 mg.kg^{-1} (respectivamente DT e DT5x) e Controle negativo (água destilada por via oral e solução de NaCl 0,9% por via subcutânea)

Parâmetro	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	P
Número total de espermatozoide (x10^6)	185,6±16,2	212,5±8,2	180,5±7,3	215,4±10,2	190,4±62,1	0,3565
Produção espermática diária (x10^6)	12,0±2,3	11,1±2,3	14,6±0,8	14,6±0,8	15,5±0,4	0,5501
Defeitos espermáticos totais (%)	3,8±0,7	3,5±0,7	3,4±0,8	5,5±0,5	5,6±1,8	0,2327
Concentração sérica de testosterona (ng/dL) *	226,5±71	220±172	183±53	293,5±164,5	92,5±20,5	0,1298

Os valores representam média±epm /ANOVA**,** *Mediana (Desvio interquartílico)/Kruskal-Wallis. Valores com a mesma letra na linha não apresentam diferença significativa, considerando P<0,05.

CAPÍTULO 4

6. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo foi delineado para identificar as possíveis alterações da associação de beta-glucana e itraconazol sobre a fertilidade de machos e fêmeas, assim como os efeitos sobre o desenvolvimento da progênie exposta ao tratamento durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação. O tempo de tratamento dos progenitores seguiu o recomendado pela OECD (2011). Para avaliação da fertilidade, os machos devem ser tratados durante 8-10 semanas antes do acasalamento, cobrindo assim no mínimo quatro ciclos do epitélio espermatogênico, garantindo a inclusão completa da espermatogênese. Nas fêmeas é indicado iniciar o tratamento duas semanas antes do acasalamento, objetivando abranger 3-4 ciclos estrais completos.

A teratogenicidade de qualquer fármaco depende do momento da exposição, da dose, das características que afetam a passagem placentária e da susceptibilidade de cada indivíduo. No período de implantação, o embrião não é susceptível a teratogenicidade. No entanto, o primeiro trimestre da gestação, que inclui a fase de organogênese é o período crítico para o desenvolvimento das principais más-formações. Os efeitos decorrentes da exposição aos agentes durante o segundo e o terceiro trimestres da gestação geram defeitos funcionais e anomalias menos significativas (CARDONICK e IOCOBUCCI, 2004). No rato, considera-se que o período de implantação vai até o 6º dia de gestação, a organogênese do 6º ao 15º dia e a partir deste último até o parto considerasse como período de desenvolvimento fetal (BERNARDI, 2006).

É desconhecida a capacidade do itraconazol de cruzar a barreira placentária, contudo, considerando seu peso molecular, acredita-se que essa passagem ocorra. Apesar das concentrações baixas, o itraconazol também já foi detectado no leite materno de mulheres que receberam apenas duas doses de 200 mg de itraconazol. Deve se ressaltar que a concentração sérica destas mulheres também era baixa se comparadas a voluntários recebendo a mesma dose por 15 dias, sendo que estes últimos apresentaram cerca de 15 vezes mais que a média do pico das lactantes (BRIGGS et al., 2001). Assim podemos supor que a progênie do presente estudo foi exposta indiretamente ao itraconazol tanto durante a fase de desenvolvimento fetal como de lactação.

Foram utilizadas, neste estudo, as doses de 10 $mg.kg^{-1}$ de itraconazol e 0,5 mg/rato de beta-glucana, consideradas terapêuticas por Martins (2008). A dose mínima de itraconazol coincide com a utilizada por Van Cauteren et al. (1987) durante a gestação em ratas. Os mesmos autores utilizaram 160 $mg.kg^{-1}$ como dose máxima. A doses estudadas por Tiboni et al. (2006) variaram de 50 a 250 $mg.kg^{-1}$ administrados em dose única nos dias 8, 9, 10, 11 ou 12 da gestação. Convém destacar que nos estudos anteriormente citados, a administração dos fármacos se limitou ao período gestacional, não investigando os desdobramentos referentes ao tratamento prolongado, tais como o efeito cumulativo. No presente estudo optou-se pela manutenção da dose fixa da beta-glucana e uso de doses progressivas do itraconazol, visto a utilização frequente de doses elevadas do itraconazol em casos considerados mais complexos.

As doses utilizadas de itraconazol, mesmo as mais elevadas em associação, e de beta-glucana não demonstraram causar toxicidade sistêmica em nenhum dos sexos nos períodos estudados. Meinerz et al. (2007) já haviam estudado a administração de itraconazol em ratos por 30 dias na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ sem identificarem sinais de toxicidade. A administração oral de beta-glucanas extraídas da *Ganoderma lucidum* e *Lentinula edodes* foram estudadas nas doses de 2000 $mg.kg^{-1}$ e 2500 $mg.kg^{-1}$, via oral, respectivamente, e não demonstraram sinais de toxicidade grave (MORIYUKI e ICHIMURA, 1980; CHEN et al., 2011).

Os achados nos machos do presente estudo sugerem que o itraconazol em doses elevadas induza alterações funcionais da fertilidade masculina, pois, apesar das alterações encontradas na concentração sérica de testosterona, nos parâmetros espermáticos e nos índices reprodutivos, não foram observadas lesões histopatológicas dos órgãos reprodutivos, de forma semelhante às induzidas pelo fluconazol. A administração diária de fluconazol em coelhos provocou diminuição do volume seminal, da contagem e da motilidade espermática, no entanto estas alterações foram reversíveis (EL-MEDANY e HAGAR, 2002). Em homens, apesar de discreta, a administração de fluconazol ocasionou efeitos na concentração de testosterona e corticosteróides e na resposta do cortisol à estimulação por ACTH (DIFLUCAN, 2010). Em relação ao itraconazol, doses inferiores a 40 $mg.kg^{-1}$ não demonstraram efeito sobre a fertilidade de ratos machos. Sinais mais severos, incluindo morte, foram relatados com o uso de 160 $mg.kg^{-1}$. Em humanos, são relatadas impotência e redução de libido (SPORANOX, 2012).

Outros azoles também tem demonstrado influenciar a fertilidade de machos. A

diminuição da fertilidade foi observada em camundongos tratados com cetoconazol, com declínio da motilidade e densidade espermática (JOSHI et al., 1994). Essa ruptura da homeostase da testosterona parece estar envolvida na toxicidade reprodutiva dos antifúngicos, tanto diminuindo como aumentando a concentração de testosterona. Se, de um lado, alguns antifúngicos azólicos, tais como cetoconazol, econazole e miconazole diminuem os níveis de testosterona, ocasionando efeitos desmasculinizantes, evidenciados pela diminuição da distância anorretal de fetos machos de ratos (KJÆRSTAD et al., 2010), por outro, altas doses de triazólicos, foram relacionadas com aumento da testosterona sérica, do peso dos testículos e da distância anorretal em fetos de ratos, o que indica hipervirilização (GOETZ et al., 2007). Esta diferença demonstra que os diversos azóis interferem com diferentes mecanismos sobre a reprodução.

Os resultados obtidos nas fêmeas sugerem que as doses mais elevadas de itraconazol na associação com beta-glucana afetam a fertilidade e podem causar embriotoxicidade e teratogenicidade. O papel do itraconazol nestes resultados deve estar relacionado à potencial capacidade de ação dos azóis como desreguladores endócrinos. Outros mecanismos, como a alteração da composição celular da placenta descrita para o cetoconazol (FURUKAWA et al., 2008) podem estar envolvidos. Visto a importante função da placenta no desenvolvimento e crescimento dos fetos, as possíveis interferências dos azóis na mesma não podem ser desconsideradas no presente estudo. Em humanos, já foram determinadas alguns aspectos da função da placenta que são considerados críticos para o feto: adequada invasão dos trofoblastos; aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário durante a gestação; transporte de nutrientes da mãe para o feto, tais como aminoácidos eglicose; e a produção e transferência de hormônios reguladores do crescimento (Murphy et al. 2006).

É interessante notar que as taxas de perdas pós-implantação foram significativamente maiores nos animais tratados com beta-glucana isolada ou em associação com o itraconazol. O mecanismo que levou a esta alteração não está esclarecido, mas é possível que o aumento da atividade das células NK, desencadeada pela beta-glucana (PELIZON et al., 2005), possam aumentar a taxa de perdas pós-implantação e de reabsorção fetal.

Observou-se que a exposição das mães ao itraconazol em doses elevadas na associação com beta-glucana acarretou em aumento da frequência de teratogenias. O itraconazol, em estudos em ratos e camundongos, demonstrou potencial teratogênico. Em ratos foi principalmente relacionado a defeitos esqueléticos, enquanto em

camundongos à macroglossia e encefalocele (SPORANOX, 2012). Tiboni et al. (2006) relataram fendas palatinas e defeitos em membros nos fetos de mães expostas ao itraconazol. O mecanismo que promovem a teratogenia em fetos exposto ao itraconazol ainda não estão completamente esclarecidos. Sugere-se que a inibição de enzimas ligadas ao citocromo P450, especialmente a CYP26, interfira na homeostase do ácido retinóico embriônico, e que este desequilíbrio acarrete nos efeitos teratogênicos (GIAVINI e MENEGOLA, 2010; MAROTTA e TIBONI, 2010). O ácido retinóico possui papel importante no controle de genes específicos durante o desenvolvimento fetal e, consequentemente, papel fundamental na embriogênese (ROSS et al., 2000). Outras enzimas ligadas ao citocromo P450 no embrião e que participem do desenvolvimento fetal, também podem estar envolvidas (GIAVINI e MENEGOLA, 2010). Os diferentes graus de inibição de cada enzima explicam as diferenças encontradas entre os diversos azóis. Os principais achados teratogênicos no presente estudo (ossificações incompletas cranianas, estérnebras irregulares e alterações na ossificação da coluna vertebral) não coincidem com o estudo anterior com itraconazol, que destacava a fenda palatina e os defeitos de membros como principais alterações (TIBONI et al., 2006). Esta diferença pode estar relacionadas à dose e ao tempo de exposição ao itraconazol, o qual poderia em longo prazo desenvolver graus diferentes de inibição de diversas enzimas ligadas ao citocromo P450; ou ainda, esta diferença entre as teratogenias podem estar relacionadas à interferência direta da beta-glucana. Oliveira et al. (2009) sugerem que, em estudo com ciclofosfamida em camundongos, a beta-glucana poderia alterar as vias metabólicas que envolvam a CYP e/ou ligar-se ao fármaco, seus metabólitos ou ainda radicais livres gerados na mãe. Os mesmos autores indicam que, apesar de desconhecer se a beta-glucana sofreu metabolismo, ela cruzou a barreira placentária e foi capaz de alterar o processo induzido pela ciclofosfamida no embrião.

Em humanos, não está bem claro se o itraconazol causa alterações teratogênicas. Em estudo retrospectivo com mulheres gestantes, foi observado que a exposição ao itraconazol no primeiro trimestre da gestação aumentou o risco de anomalias congênitas em quatro vezes (BAR-OZ et al, 1999). Já em estudos prospectivos não foram evidenciados tais riscos (SANTIS et al., 2009; BAR-OZ et al, 2000). Esse viés pode ser decorrente do fato que famílias em que ocorreram más-formações tenderem a relatar mais a exposição aos fármacos (BAR-OZ et al, 1999). No presente estudo, o itraconazol em doses terapêuticas não pareceu aumentar o risco de teratogenias. Contudo doses

cinco vezes mais elevadas de itraconazol já demonstraram tal potencial. Assim, o itraconazol deve ainda ser usado com cautela durante a gestação.

Foram observados apenas discreto, mas estatisticamente significativo, retardo em alguns dos parâmetros (aparecimento dos pelos, descida testicular e abertura vaginal) da avaliação do desenvolvimento físico da prole no grupo em que as mães foram exposta a cinco vezes a dose terapêutica associada à beta-glucana. Não houve diferença nos demais parâmetros observados na prole, tais como os de desenvolvimento neurolocomotor, comportamento em campo aberto, comportamento reprodutivo e parâmetros espermáticos. A causa deste atraso pode estar relacionada à inibição da biossíntese de estrógenos e andrógenos, por ação no citocromo P450, e/ou dos receptores dos andrógenos e estrógenos (KJÆRSTAD et al. 2010). É interessante perceber que não se manifestaram efeitos na puberdade, longo tempo após o término da exposição via lactação. Devido ao baixo número de ninhadas nascidas, não foi possível avaliar o comportamento sexual em doses elevadas de itraconazol na associação. É possível que ocorra interferência no comportamento sexual nos grupos com dose mais elevada de itraconazol, visto que a diferenciação sexual cerebral em ratos abrange do final da gestação aos primeiros dias pós-natal (BERNARDI, 2006).

A interação dos azólicos com outros medicamentos é muito destacada, pois se encontra entre os medicamentos que apresentam maior capacidade inibitória do metabolismo de outros fármacos (AZANZA et al., 2007). Essas interações tem se mostrado de grande importância, não só na toxicidade sistêmica, como na reprodutiva e na teratogenicidade. A coadministração de fluconazol e contraceptivos em mulheres ocasionou aumento significativo nos níveis de etinil estradiol e levonorgestrel (DIFLUCAN, 2010). O pré-tratamento com fluconazol, em doses não teratogênicas, dobraram a incidência de teratogênia nos fetos de mães exposta a fenitoína (TIBONI et al., 1999). Em outro estudo, Tiboni et al. (2008) verificaram que a co-exposição de metronidazol e miconazol em fêmeas de camundongos gestantes acarretou em 26,6% dos fetos apresentando defeitos do esqueleto axial, o que foi muito superior ao apresentado quando administrados os fármacos de forma isolada, os quais não passaram de 5,6% de defeitos. Esses dados corroboram com os encontrados por Kazy et al. (2005) que observaram que o tratamento conjunto de miconazol e metronidazol via vaginal foi mais prevalente em mães que geraram crianças com poli/sindactilia. Tais resultados revelam que apesar de serem considerados seguros como agentes únicos via vaginal, deve-se ter grande cuidado quando usado em associação com outros fármacos por

qualquer via. A exposição a associação de fármacos pode gerar interações tipo inibitória, aditiva ou potencializadora, sendo importante os estudos avaliando os fármacos isolados e em associação para se determinar a segurança (ASSIS e DALSENTER, 2009).

Enquanto, de um lado, a interação dos azólicos com outros fármacos, de maneira geral, aumenta o risco de toxicidade e consequentemente dos efeitos, de outro lado, tem sido atribuído à beta glucana potencial protetivo. Foram descritas para beta-glucana as capacidades de radioproteção (PELIZON et al., 2005), anti-inflamatória, antimutagênica (MAGNANI e CASTRO-GÓMEZ, 2008), de proteção miocárdica após lesão de isquemia/reperfusão, na cicatrização de feridas (CHAUNG et al., 2009); desmutagênica e bioantimutagênica (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007) e de redução ou bloqueio da imunossupressão causada por agente tóxicos (VETVICKA, 2013). Oliveira et al. (2009) relataram que a beta-glucana diminui os efeitos nos fetos da exposição maternal à ciclofosfamida, principalmente relacionados a viabilidade e as perdas pós-implantação. O presente estudo não demonstrou interação significativa entre o itraconazol e a beta-glucana. Se houve algum poder protetivo da beta-glucana frente aos efeitos das doses elevadas de itraconazol, esta não foi capaz de bloquear completamente os efeitos reprodutivos. De qualquer modo, a interação não parece promover toxicidade, visto que os resultados da associação dos fármacos em doses terapêuticas não diferiram em nenhum parâmetro avaliado dos fármacos administrados isoladamente nas mesmas doses.

O delineamento do presente estudo não permite esclarecer completamente a participação da beta-glucana na associação com itraconazol em doses mais elevadas, conferindo apenas uma visão geral desta associação. O baixo número de nascimentos, ou ausência de nascimentos a termo, nos grupos com maior dose de itraconazol também podem ser encarados como limitadores do estudo, pois não permitiu adequada inferência sobre os efeitos desta associação no desenvolvimento da prole nestas condições.

Não foram evidenciados sinais de toxicidade sistêmica nos animais, machos ou fêmeas, submetidos aos diferentes tratamentos deste estudo. A toxicidade sistêmica não era esperada no presente estudo, visto que outros trabalhos demonstraram que as doses utilizadas de itraconazol (MEINERZ et al., 2007) e de beta-glucana (MORIYUKI e ICHIMURA, 1980; CHEN et al., 2011) não desenvolvem toxicidade sistêmica.

Os fármacos na dose terapêutica, em associação ou isolados, não apresentaram

alterações na fertilidade e no desenvolvimento dos fetos/filhotes, exceto as perdas pós-implantação relacionadas à beta-glucana. Destaca-se que essas mesmas doses demonstraram eficácia terapêutica, podendo ser indicada clinicamente (MARTINS, 2008).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, conclui-se que as doses terapêuticas da ß-glucana e do itraconazol, isoladas ou em associação, não interferem nas variáveis reprodutivas estudadas em machos ou fêmeas, exceto taxa de perdas pós-implantação. As doses elevadas de itraconazol na associação com beta-glucana demonstram alterar significativamente as variáveis reprodutivas de machos e fêmeas. Os resultados sugerem que os efeitos sobre a fertilidade do macho sejam funcionais. Salienta-se o potencial teratogênico e embriotóxico das doses mais elevadas de itraconazol associadas à beta-glucana, como também atraso, apesar de discreto, em alguns parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes. Recomenda-se cautela na utilização de altas doses de itraconazol associado ou não a ß-glucana, principalmente em terapias prolongadas. Apesar de a associação de itraconazol e beta glucana parecer segura em doses terapêuticas, seu uso durante a gestação deve ser ponderado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.

ASSIS, H. C. S.; DALSENTER, P. R. Agrotóxicos: Testes toxicológicos pré-clínicos e ecotoxicológicos. **Toxicovigilância – Toxicologia Clínica: dados e indicadores selecionados, Rio Grande do Sul – 2008-2009**, Porto Alegre, p.29-38, 2009.

AZANZA, J.R.; GARCÍA-QUETGLAS, E.; SÁDABA, B. Farmacología de los azoles. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 223-227, 2007.

AZEVEDO, C.M.P.S.; MARQUES, S.G.; RESENDE, M.A.; GONÇALVES, A.G.; SANTOS, D.V.C.L.; SILVA, R.R.; SOUSA, M.G.T.; ALMEIDA, S.R. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of a severe case of chromoblastomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 341–344, 2008.

BAR-OZ, B.; MORETTI, M.E.; BISHAI, R.; MAREELS, G.; VAN TITTELBOOM, T.; VERSPEELT, J.; KOREN, G. Pregnancy outcome after in utero exposure to itraconazole: a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 3, p. 617-620, 2000.

BAR-OZ, B.; MORETTI, M.E.; MAREELS, G.; VAN TITTELBOOM, T.; KOREN G. Reporting bias in retrospective ascertainment of drug-induced embryopathy. **Lancet**, v. 13, n. 354, p. 1700-1701, 1999.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 807-816.

BEULE, K.; GESTEL, J. Pharmacology of Itraconazole. **Drugs**, v. 61, supl. 1, p. 27-37, 2001.

BOOGAERTS, M.; MAERTENS, J. Clinical experience with itraconazole in systemic fungal infections. **Drugs**, v. 61, suppl 1, p. 39-47, 2001.

BRIGGS, G.G.; FREEMAN, R.K.; YAFFE, S.J. **Drugs in Pregnancy and Lactation**, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. 1595p.

CARDONICK, E.; IACOBUCCI, A. Use of chemotherapy during human pregnancy. **The Lancet Oncology**, v. 5, p. 283–291, 2004.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CAZEDEY, E.C.L.; AZEVEDO, R.C.P.; SILVA, É.F.; ARAÚJO, M.B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de Itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.

CHAUNG, H.C.; HUANG, T.C.; YU, J.H.; WU, M.L.; CHUNG, W.B. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 131, n. 3-4, p. 147-157, 2009.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.

CHEN, S.N.; NAN, F.H.; CHEN, S.; WU, J.F.; LU, C.L.; SONI, M.G. Safety assessment of mushroom β-glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2890–2898, 2011.

COSTA, E.O.; GÓRNIAK, S.L. Agentes antifúngicos e antivirais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 487-500.

COX, C.M.; STUARD, L.H.; KIM, S.; MCELROY, A.P.; BEDFORD, M.R.; DALLOUL, R.A. Performance and immune responses to dietary β-glucan in broiler chicks. **Poultry Science,** v. 89, n. 9, p.1924-1933, 2010.

CRISPIM, J.C.O; MEDEIROS, A.C.; SALES, V.S.F. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 296-307, 2004. Disponível em URL:http://www.scielo.br/acb.

DIFLUCAN [bula]. New York: Pfizer, 2010. Disponível em: <http://www.pfizer.com/files/products/uspi_diflucan.pdf> Acesso em: 10 out. 2010.

EL-MEDANY, A.H.; HAGAR, H.H. Effect of fluconazole on the fertility of male rabbits. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n.8, p. 636-640, 2002.

ESTRADA, A.; YUN, C.H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 12, p. 991-998, 1997.

FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, São Paulo: Roca, p. 59-72, 2002.

FURUKAWA, S.; HAYASHI, S.; USUDA, K.; ABE, M.; OGAWA, I. Histopathological effect of ketoconazole on rat placenta. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 11, p. 1179-1184, 2008.

GARCIA, N.G.; OLIVEIRA, D.T.; PEREIRA, A.A.; MAGALHÃES, E.M.S.; HANEMANN, J.A. Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and β-glucan. **International Journal of Dermatology**, Epub ahead of print, 2013.

GIAVINI E.; MENEGOLA E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 106–111, 2010.

GOETZ, A.K.; REN, H.; SCHMID, J.E. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 1, p. 227–239, 2007.

HAHN, T.-W.; LOHAKARE, J.D.; LEE, S.L.; MOON, W.K.; CHAE, B.J. Effects of supplementation of β-glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. **Journal of Animal Scienc**e, v. 84, n. 6, p. 1422-1428, 2006.

HISS, S.; SAUERWEIN, H. Influence of dietary ss-glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n.1-2, p. 2-11, 2003.

JOSHI, S.C.; JAIN, G.C.; LATA, M. Effects of ketoconazole (an imidazole antifugal agent) on the fertility and reproductive function of male mice. **Acta Europaea Fertilitatis**, v. 25, n. 1, p. 55-58, 1994.

KAZY, Z.; PUHÓ, E.; CZEIZEL, A.E. The possible association between the combination of vaginal metronidazole and miconazole treatment and poly-syndactyly

Population-based case–control teratologic study. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 89–94, 2005.

KHOSRAVI, A.R.; SHOKRI, H.; TOOTIAN, Z.; ALIZADEH, M.; YAHYARAEYAT, R. Comparative efficacies of Zataria multiflora essential oil and itraconazole against disseminated Candida albicans infection in Balb/C mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, 439–445, 2009.

KJÆRSTAD, M. B.; TAXVIG, C.; NELLEMANN, C. et al. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 573-582, 2010.

KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P.W.J. Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF,K.; BRUL,S. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

LELIÈVRE, L.; GROH, M., ANGEBAULT, C.; MAHERAULT, A-C.; DIDIER, E.; BOUGNOUX, M.-E. Azole resistant Aspergillus fumigatus: an emerging problem. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 4, 139–145, 2013.

LESTNER, J.M.; ROBERTS, S.A.; MOORE, C.B.; HOWARD, S.J.; DENNING, D.W.; HOPE W.W. Toxicodynamics of itraconazole: implications for therapeutic drug monitoring. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 928-930, 2009.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. β -glucana de Saccharomyces cerevisiae: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MAROTTA, F.; TIBONI, G.M. Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 461-82, 2010.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Braisileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MARTINS, A.A. **Avaliação do uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente ou em associação ao itraconazol na esporotricose experimental**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F.D.; ANTUNES, T.A.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 105-109, 2007.

MEIS, J.F.G.M.; VERWEIJ, P.E. Current Management of Fungal Infections. **Drugs**, v. 61 supl. 1, p. 13, 2001.

MORIYUKI, H.; ICHIMURA, M.. Acute toxicity of lentinan in mice and rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, 5, suppl. 1-9, 1980. (resumo)

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural,** v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

OECD. Guideline for the testing of chemicals. Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. **ENV/MC/CHEM**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011.

OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.;SILVA, A.F.;MATIAZI, H.J.; MONTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R. Protective effect of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2007.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; DA SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of beta-glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1225-1233, 2006.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.S.; SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.D.S.; FREIRIA, G. A.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M. S. Effects of the polysaccharide beta-glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 164–173, 2009.

PANDYA, N.A.; ATRA, A.A.; RILEY, U.; PINKERTON, C.R. Role of itraconazole in haematology/oncology. **Archives of Disease in Childhood**, v. 88, n. 3, p.258–260, 2003.

PELIZON, A.C.; KANENO, R.; SOARES, A.M.V.C.; MEIRA, D.A.; SARTORI, A. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from Saccharomyces cerevisiae. **Physiological Research**, v. 54, n. 5, p. 557–564, 2005.

PRENTICE, A.G.; GLASMACHER, A. Making sense of itraconazole pharmacokinetics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, supl. 1, i17-i22, 2005.

RIZZO, J.Â.; MEDEIROS, D.; MOTTA, M.E.F.A.; AZOUBEL, A.; COSTA, A.; SCHORR, D.; SILVA, A.R.; SALES, V.; SARINHO, E.C.S. Eventos adversos com o uso e Beta1, 3-D-Glucana em crianças asmáticas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 31, n. 6, p. 230-236, 2008.

ROSS, S.A.; MCCAFFERY, P.J.; DRAGER, U.C.; DE LUCA, L.M. Retinoids in embryonal development. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, 1021–1054, 2000.

RÜPING, M.J.G.T.; VEHRESCHILD, J.J.; CORNELY, O.A. Patients at high risk of invasive fungal infections. **Drugs**, v. 68, n. 14, p. 1941-1962, 2008.

SANTIS, M.; GIANANTONIO, E.; CESARI, E.; AMBROSINI, G.; STRAFACE, G.; CLEMENTI, M. First-Trimester Itraconazole Exposure and Pregnancy Outcome. **Drug Safety**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2009.

SANTOS, L.S.; BERNARDES, R.C.; MAGALHÃES, L.M.; SIQUEIRA, F.S.; KHOURI, S Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 13., 2009, São José dos Campos. **Anais …** São José dos Campos: Univap, 2009. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_0612_1324_01.pdf.

SHARKEY, P.K.; RINALDI, M.G.; DUNN, J.F.; HARDIN, T.C.; FETCHICK, R.J.; GRAYBILL, J.R. High-dose itraconazole in the treatment of severe mycoses **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 4, p. 707–713, 1991.

SILVA, F.V.; MARTINS, A.A.; ANTUNES, T.Á.; SCHUCH, L.F.; FERNANDES, C.G.; XAVIER, M.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Avaliação anatomopatologica e histopatologica de ratos wistar com esporotricose experimental tratados com β - Glucana associada ao itraconazol. In: Congresso de Iniciação

Científica, 18., 2008, Pelotas. **Anais ...** Pelotas: UFPEL. 2008. Disponível em: http://www2.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_01467.pdf .

SILVA, M.L.C.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.F.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 85-92, 2006.

SKOV, M.; MAIN, K.M.; SILLESEN, I.B.; MÜLLER, J.; KOCH, C.; LANNG, S. Iatrogenic adrenal insufficiency as a side-effect of combined treatment of itraconazole and budesonide. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 1, p. 127–133, 2002.

SPORANOX [Product Information], Titusville: Janssen Pharmaceutica, 2012. Disponível em: http://www.janssenpharmaceuticalsinc.com/assets/sporanox.pdf. Acessado em: dez 2013

TABOADA, J.; GROOTERS, A M. Systemic antifungal therapy. In: MADDISON, J.E.; PAGE, S.W. **Small Animal Clinical Pharmacology.** Philadelphia: Elsevier, 2008, p. 186-197.

TIBONI, G.M.; IAMMARRONE, E.; GIAMPIETRO, F.; LAMONACA, D.; BELLATI, U.; DI ILIO, C. Teratological interaction between the bis-triazole antifungal agent fluconazole and the anticonvulsant drug phenytoin. **Teratology**, v. 59, n. 2, p. 81–87, 1999.

TIBONI, G.M.; MAROTTA, F.; DEL CORSO, A.; GIAMPIETRO, F. Defining critical periods for itraconazole-induced cleft palate, limb defects and axial skeletal malformations in the mouse. **Toxicology Letters**, v. 167, n. 1, p. 8-18, 2006.

TIBONI, G.M.; MAROTTA, F.; CASTIGLIEGO, A.P. Teratogenic effects in mause fetuses subjected to the concurrent in útero exposure to miconazole e metronidazole. **Reproductive Toxicology**, v. 26, p.254-261, 2008.

TUCKER, R. M.; HAQ, Y.; DENNING, D. W.; STEVENS, D. A. Adverse events associated with itraconazole in 189 patients on chronic therapy **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, n. 4, p. 561-566, 1990.

VAN CAUTEREN, H.; HEYKANTS, J.; COSTER, R.; CAUWENBERGH, G. Itraconazole: pharmacologic studies in animals and humans. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, suppl. 1, p. S43-S46, 1987.

VETVICKA, V. Effects of β-glucan on some environmental toxins: An overview. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Epub ahead of print, 2013.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 159-169, 2001.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A.; REDMOND, M.; LAARVELD, B. Immunomodulatory effects of oat β-glucan administered intragastrically or parenterally on mice infected with eimeria vermiformis. **Microbiology and Immunology**, v. 42, n. 6, p. 457-465, 1998.

ZONIOS, D.I.; BENNETT, J.E. Update on azole antifungals. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 198-210, 2008.