

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

Effects of the Association of Beta-glucan and Itraconazole on Fertility of Male Wistar Rats

Rafael Stedile¹, Clarissa Boemler Hollenbach¹, Fernanda Bastos de Mello²,
Fabíola Peixoto da Silva Mello¹, Rafaela Bing³, Patrícia Pisoni Rosa³,
Luciana Machado Silva³, Itatiele Farias Vivian³ & João Roberto Braga de Mello^{1,4}

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. Due to this reason, 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: Sixty male Wistar rats with 120-days-old were used. 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). 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 with 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, β -1,3-D-glucopyranose, drug interactions.

Descritores: toxicidade reprodutiva, antifúngicos, azóis, imunomodulator, β -1,3-D-glucopiranosse, 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 β -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 triazóis, apresenta amplo espectro de ação com efeitos tóxicos reduzidos, se comparado aos antifúngicos mais antigos [8]. Porém, os azóis, incluindo triazóis, 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 h, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 n. 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Fármacos e preparação das soluções de tratamento

A suspensão de itraconazol foi obtida através da maceração e mistura em água destilada estéril do conteúdo da apresentação comercial de itraconazol¹. A suspensão foi preparada diariamente e homogeneizada antes da administração oral. A concentração correspondeu à dose por quilograma de massa corporal referente a cada grupo diluída em volume de dez mililitros. Foi utilizada a apresentação comercial injetável de β (1-3) glucana². 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 (itraconazol) - 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 (β glucana) - 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 (associação nas doses terapêuticas) - 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 (associação com 5x a dose terapêutica do itraconazol) - 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 (associação com 10x a dose terapêutica do itraconazol) - 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 6 h às 8 h). 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 ($0,025 \text{ mg.kg}^{-1}$) 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 min a 1200 g , para obtenção de soro, sendo o mesmo acondicionado em microtubo e mantido a -20°C . A determinação da concentração sérica de testosterona foi realizada através da quimiluminescência utilizando *kit* comercial em aparelho automático³. 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 tecidual⁴ na velocidade de 600 rpm, durante 1 min. 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 $0,1 \text{ mm}^3$.

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 \pm erro padrão médio (epm) e os com distribuição assimétrica como mediana \pm intervalo interquartil. 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

Varição 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 (respectivamente $P = 0,363$ e $P = 0,229$).

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 β -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.

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 \pm epm.

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

Valores com a mesma letra na linha não apresentam diferença significativa, considerando $P < 0,05$. *Mediana \pm Desvio interquartilico.

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.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para identificar interferências da associação de β -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 β -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 β -glucana extraída de *Ganoderma lucidum*, na dose de 2000 mg.kg⁻¹ [7].

Em doses consideradas terapêuticas, a β -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 azóis podem potencialmente agir no citocromo P450 dos mamíferos, interferindo na síntese de esteroides, causando inibição da biossíntese de estrógenos e andrógenos. Alguns azóis 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 β -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 β -glucana diminuíram os parâmetros espermáticos, decorrentes possivelmente da diminuição da concentração de testosterona. Deve ser evidenciado que nem todos os azóis cursam com inibição da síntese de andrógenos, pois altas doses de alguns triazóis, 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 azóis 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, espermição 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 β -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 protetor da β -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 β -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 β -glucana em machos, principalmente em terapias prolongadas.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹Itraconazol Genérico- Prati-Donaduzzi, Toledo, PR, Brazil.

²Imunoglucan - Laboratório Hebron Farmacêutica, Caruaru, PE, Brazil.

³Immulate 1000 - Siemens AG, Erlangen, Germany.

⁴Fisatom 720 - Fisatom, São Paulo, SP, Brazil.

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

Ethical approval. 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).

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 Chung 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. & Górnaiak S.L. 1996. Agentes antifúngicos e antivirais. In: Spinosa H.S., Górnaiak 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. & Fuentesfria 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). Disponível em: <<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>>. Acessado em 08/2013.
- 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 Veterinárias) - 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 antifungal 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 *Sporothrix 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 \rightarrow 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.