

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

Reproductive Toxicity of Itraconazole in Combination with Beta-Glucan in Female Rats and their Offspring

Rafael Stedile<sup>1</sup>, Clarissa Boemler Hollenbach<sup>2</sup>, Fernanda Bastos de Mello<sup>2</sup>,  
Fabiola Peixoto da Silva Mello<sup>2</sup>, Rafaela Scheer Bing<sup>2</sup>, Patrícia Pisoni da Rosa<sup>2</sup>,  
Luciana Machado da Silva<sup>2</sup>, Itatiele Farias Vivian<sup>2</sup> & João Roberto Braga de Mello<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Reports of yeast isolates resistant to traditional antifungal drugs have become common. Similarly, refractory clinical cases treated with these traditional antifungal drugs have also been reported. These cases 'may or may not be related to pregnancy. Newly developed therapeutic approaches, such as the immunostimulant  $\beta$ -glucan combined with the traditional antifungal agents show promising results. Therefore, knowledge of the effects of these new associations is essential. The aims of this study were to evaluate the effects of the combination of itraconazole and  $\beta$  (1-3) glucan on fertility in female rats and its interference in the development of their offspring, including teratogenic potential.

**Materials, Methods & Results:** A total of 180 female Wistar rats (90 days old) separated into six groups were used (n = 30 per group): Negative Control - treated daily with the volume corresponding to 10 mL.kg<sup>-1</sup> of sterile distilled water orally, and 0.25 mL of sterile 0.9% NaCl solution subcutaneously weekly; IT - treated daily with itraconazole at a dose of 10 mg.kg<sup>-1</sup> orally, and 0.25 mL of sterile 0.9% NaCl solution subcutaneously weekly; Beta - treated daily with the volume corresponding to 10 mL.kg<sup>-1</sup> of sterile distilled water orally, and 0.5 mg of  $\beta$  (1-3) glucan subcutaneously weekly; DT - treated daily with itraconazole at a dose of 10 mg.kg<sup>-1</sup> orally, and 0.5 mg of  $\beta$  (1-3) glucan subcutaneously weekly; DT5x - treated daily with itraconazole at a dose of 50 mg.kg<sup>-1</sup> orally, and 0.5 mg of  $\beta$  (1-3) glucan subcutaneously weekly; DT10x - treated daily with itraconazole at a dose of 100 mg.kg<sup>-1</sup> orally, and 0.5 mg of  $\beta$  (1-3) glucan subcutaneously weekly. The 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 of females, including maternal behavior, fetal skeletal abnormalities, and indicators of physical and neuromotor development in the offspring, including behavior in the open field and sexual behavior, were evaluated. The main differences ( $P < 0.05$ ) between groups were the mating index, birth index and post-implantation loss index, the body mass of pups at birth and skeletal abnormalities of fetuses. Among the fetal skeletal abnormalities, statistical differences ( $P < 0.05$ ) were observed in the percentage of: thoracolumbar supernumerary ribs (apparent and rudimentary); incomplete ossification of the parietal, interparietal, supraoccipital, sternbrae, cervical spine and tail; enlarged fontanel; lateral ossification centrum in the 7th cervical vertebra; misshapen and absent sternbrae; and misshapen vertebral centrum. No statistically significant differences in weight development of the pups and in open field test and sexual behavior test were observed.

**Discussion:** The results of this study showed that high doses of itraconazole in combination with  $\beta$  (1-3) glucan have embryotoxic potential, including teratogenic effects. The embryotoxicity is also possibly related to  $\beta$  (1-3) glucan, which showed the same effect even when administered alone. Delays in some physical indicators, though discreet, indicate effects of higher doses of itraconazole on offspring development. The data demonstrate that the combination of itraconazole and  $\beta$  (1-3) glucan have potential interference in the fertility of mothers and the development of fetuses /pups. Although the combination of itraconazole and  $\beta$  (1-3) glucan seem safe at therapeutic doses, caution is advised in the administration of these drugs, alone or combined, during pregnancy, with special attention needed for higher doses of itraconazole.

**Keywords:** fertility, antifungal, azoles, immunomodulator,  $\beta$ -1,3-D-glucopyranose, drug interactions, teratogenicity.

**Descritores:** fertilidade, antifúngicos, azóis, imunomodulador,  $\beta$ -1,3-D-glicopiranosse, interações farmacológicas, teratogenicidade.

## INTRODUÇÃO

As infecções durante a gestação são situações de difícil manejo, pois neste período, o organismo está sujeito a uma série de mudanças fisiológicas, que afetam farmacocinética [35]. A escolha de fármacos durante a gestação é sempre problemática, pois estima-se que 0,04-0,15% dos neonatos apresentem más-formações decorrentes de medicamentos [14].

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 [16]. Dentre os antifúngicos mais utilizados encontra-se o itraconazol. É crescente os relatos de isolados fúngicos resistentes e casos clínicos refratários ao tratamento [15,18,22] devido, principalmente, à sua utilização indiscriminada. Neste sentido, novas alternativas terapêuticas tem sido desenvolvidas com resultados promissores, tais como a associação de  $\beta$ -glucana, estimulante do sistema imune, a antifúngicos tradicionais [3,10,12,21]. Essas interações, tais como do itraconazol com a  $\beta$ -glucana, necessitam de entendimento, o qual deve abranger os efeitos sobre a reprodução e ontogênese. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da associação de itraconazol e  $\beta$  (1-3) glucana sobre a fertilidade em ratas e as interferências no desenvolvimento da progênie, incluindo o potencial teratogênico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

Utilizou-se 240 ratos Wistar, sendo 180 fêmeas (90 dias de idade) e 60 machos (120 dias de idade), com padrão sanitário convencional. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (40 x 33 x 16,5 cm) forradas com maravalha, trocada três vezes por semana, com ração comercial e água *ad libitum*, e submetidos a uma semana de adaptação. Foram mantidos em ciclo claro das 8:00 às 20:00, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e a umidade relativa do ar controlada.

### *Fármacos e preparação das soluções de tratamento*

O conteúdo da apresentação comercial de itraconazol (Itraconazol - Lotes: 09F325 e 11107R)<sup>1</sup> 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 10 mL. A solução foi homogeneizada imediatamente antes dos tratamentos. Foi utilizada a apresentação comercial injetável de  $\beta$  (1-3) glucana (Imunoglucan<sup>®</sup> - Lote: PE49647)<sup>2</sup>, extraída do *S. cerevisiae*, em concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

### *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<sup>-1</sup> de água destilada estéril por via oral (VO) e 0,25 mL de solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente por via subcutânea (SC); IT - tratado diariamente com 10 mg.kg<sup>-1</sup> de itraconazol (VO) e 0,25 mL de solução de NaCl 0,9% estéril semanalmente (SC); Beta - tratado diariamente com 10 mL.kg<sup>-1</sup> de água destilada estéril (VO) e 0,5 mg de  $\beta$ -glucana semanalmente (SC); DT - tratado diariamente com 10 mg.kg<sup>-1</sup> de itraconazol (VO) e 0,5 mg de  $\beta$ -glucana semanalmente (SC); DT5x - tratado diariamente com 50 mg.kg<sup>-1</sup> de itraconazol (VO) e 0,5 mg de  $\beta$ -glucana semanalmente (SC); DT10x - tratado diariamente com 100 mg.kg<sup>-1</sup> de itraconazol (VO) e 0,5 mg de  $\beta$ -glucana semanalmente (SC).

Administrou-se volume idêntico em todos os grupos (10 mL.kg<sup>-1</sup>, VO), administrado por sonda orogástrica flexível, e 0,25 mL (SC). 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 e 21 dias durante o 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 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.

Foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas (x 100): ACASALAMENTO (fêmeas com sptz no esfregaço vaginal/ acasaladas); GESTAÇÃO (fêmeas prenhes/ fêmeas com sptz no esfregaço vaginal); PARTO (fêmeas paridas a termo/ prenhes); NATALIDADE

(filhotes nascidos vivos/ filhotes nascidos); VIABILIDADE (filhotes vivos até o 4º dia de lactação/ nascidos vivos); DESMAME (filhotes ao desmame/ nascidos vivos); TERATOGENIA (filhotes com malformações macroscópicas externas/total de filhotes); PERDAS PÓS-IMPLANTAÇÃO [(sítios de implantação - fetos nascidos)/ sítios de implantação].

#### *Gestação e Cesariana*

Metade das fêmeas de cada grupo foi submetida à anestesia com a associação de tiletamina/zolazepan (50 mg.kg<sup>-1</sup>, SC) e citrato de fentanila (0,025 mg.kg<sup>-1</sup>, SC), 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 enxugados. Observaram-se os fetos em relação à vitalidade e após os mesmos foram sexados, pesados e avaliados para detecção de alterações macroscópicas externas. Os filhotes 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 (veia cava caudal), sendo em seguida, os órgãos avaliados macroscopicamente.

#### *Processo de diafanização de fetos e diagnóstico das alterações ósseas*

Os fetos provenientes de cesariana foram submetidos à técnica de diafanização de Taylor e Van Dike modificada [8]. As alterações esqueléticas foram avaliadas em microscópio estereoscópico e classificadas de acordo com o *Atlas of external and skeletal anomalies in rats* [5].

#### *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 min, nos dias 1, 5 e 10 do pós-parto, pela manhã no período claro (entre 9:00 e 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 [32] 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 2 min); 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<sup>-1</sup>, SC). Rins, adrenais, fígado, baço, linfonodos submandibulares, coração, pulmões, estômago, bexiga, ovário e útero foram removidos e suas massas mensuradas. Contou-se os implantes uterinos. Os órgãos foram preservados em formol tamponado a 10% e submetidos à avaliação histopatológica.

#### *Desenvolvimento pós-natal da prole*

Ao nascimento, os filhotes foram sexados e identificados com tinta nanquim, via SC, utilizando agulha 31G, nos coxins. Registrou-se o número de filhotes vivos e mortos e as 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 da ninhada foi mensurada diariamente até o 30º dia pós-natal e de massa individual dos filhotes 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 (bilateral), erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento dos pelos, abertura dos olhos (bilateral), descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal. No 35º dia pós-natal os filhotes foram separados de acordo com o sexo.

A avaliação do desenvolvimento neurolocomotor foi realizada em todos os filhotes no período da manhã (entre 9 h e 11 h). Observaram-se o reflexo de endireitamento (dias 2, 3, 4 e 5) e o 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 até o posicionamento voluntário em decúbito ventral (máximo de 60 s). No reflexo de geotaxia, o filhote foi colocado em rampa de tela com 30º na posição de

cefalodeclive, considerando o tempo até o cefaloacilive (máxima de 60 s). No teste de agarrar, os filhotes foram suspensos pela cauda e encorajados a agarrar-se na barra cilíndrica com as mãos, cronometrando-se a permanência (máximo 20 s). Foi permitida uma segunda tentativa.

#### *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 h e 12 h). A eutanásia foi realizada com tiopental sódico (150 mg.kg<sup>-1</sup>, IP), sendo pré-medicados com citrato de fentanila (0,025 mg.kg<sup>-1</sup>, SC). As fêmeas foram eutanasiadas no dia do estro e avaliadas de forma semelhante à mãe. As avaliações dos órgãos, da concentração sérica de testosterona e dos parâmetros espermáticos foram realizadas conforme Stedile et al. [31].

#### *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<sup>2</sup> (dividida em 25 quadrados iguais) e 50 cm de altura. O rato foi colocado em um dos cantos, virado para parede da caixa. O comportamento foi registrado em vídeo por 5 min. O teste foi realizado pela manhã (entre 9 h e 11 h). Avaliou-se: locomoção: número de vezes que o animal cruzava de um quadrado para outro (passando com todas as patas); frequência (vezes que iniciava o movimento) e o tempo em movimento (duração); duração e frequência de autolimpeza; duração e frequência em levantar (sobre as patas traseiras); defecação: número de bolos fecais eliminados; tempo de permanência nos quadrados centrais. Antes de cada teste, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%.

#### *Comportamento sexual*

Quinze casais não consanguíneos de cada grupo, com aproximadamente 100 dias de idade, foram escolhidos para o acasalamento e avaliação do comportamento sexual. Identificou-se por citologia vaginal as fêmeas em estro. O acasalamento ocorreu em caixa acrílica com maravalha no período escuro (entre 20:00 e 23:30), sob iluminação vermelha (15W). O macho foi colocado 10 min antes da fêmea para adaptação. Gravou-se os 30 min de permanência da fêmea. Avaliou-se 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 (monta com movimento profundo da pelve e desmonta rápida; e pela limpeza do genital masculino após a monta), latência de ejaculação (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 min), número de intromissões pré-ejaculação e média de intromissões por minuto.

Quando observados sptz no lavado vaginal, foi considerado o dia 0 da gestação. Na ausência de sptz, o casal foi colocado uma segunda vez em acasalamento. As fêmeas gestantes foram mantidas em caixas individuais. Os filhotes desta geração também foram avaliados de forma semelhante aos anteriores (até o 30º dia de idade). As eutanásias de ambas as gerações foram semelhantes às dos progenitores.

#### *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 interquartilico). As variáveis qualitativas foram calculadas através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Considerou-se estatisticamente significativo  $P = 0,05$ . Estes dados foram processados no programa BioEstat 5.3.

## RESULTADOS

#### *Variação da massa corporal e consumos das fêmeas*

O ganho de massa corporal no pré-acasalamento das fêmeas 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 ( $P = 0,576$ ). As médias diárias de consumos de ração (g de ração/100 g de massa corporal) e de água (mL de água/100 g de massa corporal) durante o 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*

As Tabelas 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 DT10x, assim como a massa corporal dos filhotes de mães submetidos à cesariana. A massa do útero gravídico do grupo DT10x apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos ( $P < 0,0033$ ).

A média  $\pm$  epm de dias de gestação foi de  $21,2 \pm 0,18$  (Controle),  $21,1 \pm 0,12$  (IT),  $21,1 \pm 0,16$  (Beta),  $21,4 \pm 0,2$  (DT) e  $22 \pm 0,0$  (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 às fêmeas entre os grupos ( $P = 0,194$ ).

#### *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*

A Tabela 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 ( $P = 0,03$ ). 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. 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 em todos os grupos.

#### *Desenvolvimento pós-natal da prole*

O ganho de massa desde o nascimento até o 30º dia corporal da progênie (ninhada), considerando o dia 0 como 100%, variou nos grupos experimentais entre 1111 e 1216%, não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos ( $P = 0,1557$ ). Não houve fêmeas com parto a termo no grupo DT10x.

A Tabela 5 mostra os indicadores 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. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos indicadores do desenvolvimento neurolocomotores (reflexo de endireitamento, reflexo de geotaxia e teste de agarrar) entre os grupos.

#### *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.

#### *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.

**Tabela 1.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com itraconazol (IT), β- glucana (Beta), associação de β-glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x e DT10x) e Controle Negativo.

Índice Reprodutivo	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 <sup>ab</sup>	73,3 <sup>a</sup>	53,3 <sup>ab</sup>	56,6 <sup>a</sup>	26,6 <sup>bc</sup>	6,89 <sup>c</sup>	< 0,0001
Taxa de gestação (%)	86,6	86,36	87,5	82,3	100	100	0,827
Taxa de natalidade (%)	98,24 <sup>a</sup>	99,45 <sup>a</sup>	99,31 <sup>a</sup>	99,10 <sup>a</sup>	83,63 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	< 0,0001
Taxa de perdas pós-implantação	2,56 <sup>a</sup>	10,34 <sup>b</sup>	9,38 <sup>b</sup>	13,85 <sup>b</sup>	32,10 <sup>c</sup>	73,68 <sup>d</sup>	< 0,0001
Filhotes/Ninhada (media ± epm)	8,7 <sup>ab</sup> ± 1,05	9,1 <sup>ab</sup> ± 0,27	10,3 <sup>a</sup> ± 0,56	8 <sup>ab</sup> ± 1,18	6,8 <sup>ab</sup> ± 1,58	2,5 <sup>b</sup> ± 0,5	0,0164
Alterações macroscópicas externas nos fetos/filhotes	1*	Zero	1**	Zero	Zero	Zero	0,729

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

**Tabela 2.** Índices reprodutivos de ratas (com parto a termo) tratadas com itraconazol (IT), β- glucana (Beta), associação de β-glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x e DT10x) e Controle Negativo.

Índice de Fertilidade (fêmeas com parto a termo)	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	DT10X <sup>1</sup>	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 <sup>2</sup>	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

<sup>1</sup>Sem partos a termo no grupo; <sup>2</sup>Após padronização das ninhadas em até 8 filhotes. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 3.** Índices reprodutivos de ratas (submetidas à cesariana) tratadas com itraconazol (IT), β- glucana (Beta), associação de β-glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x e DT10x) e Controle Negativo.

Índice de Fertilidade (cesariana)	Controle	IT	Beta	DT	DT5X	DT10X <sup>1</sup>	P
N (progenitores) filhotes	(5) 50	(9) 80	(7) 73	(7) 58	(4) 27	(2) 5 <sup>1</sup>	
Filhotes/ninhada	10 ± 0,70	9 ± 0,37	10,42 ± 0,68	8,28 ± 1,96	6,75 ± 2,35	2,5 <sup>2</sup> ± 0,5	0,0484
Massa corporal filhotes (g) <sup>3</sup>	5,4 <sup>a</sup> (0,3)	5,5 <sup>a</sup> (0,4)	5,1 <sup>b</sup> (0,5)	5,2 <sup>b</sup> (0,575)	4,9 <sup>c</sup> (0,6)	2,9 <sup>c</sup> (0,1)	< 0,001
Massa do útero gravídico <sup>4</sup>	72,86 <sup>a</sup> ± 5,84	68,7 <sup>a</sup> ± 3,58	77,15 <sup>a</sup> ± 6,04	73,66 <sup>a</sup> ± 11,28	66,03 <sup>a</sup> ± 7,23	13,3 <sup>b</sup> ± 9,2	0,0033

<sup>1</sup>Dois fetos mumificados (excluídos da média da massa corporal dos filhotes e da teratogenia); <sup>2</sup>P < 0,05 em relação ao Controle (ANOVA/Dunnet);

<sup>3</sup>Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls. Os valores representam mediana (desvio interquartilico). <sup>4</sup>Excluídos úteros sem fetos (apenas com implantes). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

**Tabela 4.** Defeitos esqueléticos dos fetos de ratas tratadas com itraconazol (IT), - glucana (Beta), associação de -glucana com três diferentes doses de itraconazol (DT, DT5x e DT10x) e Controle Negativo.

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

\*Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (teste qui-quadrado); \*\*Teste qui-quadrado tendência ( $P = 0,03$ ); Valores em porcentagem.

**Tabela 5.** Indicadores do desenvolvimento físico pós-natal de filhotes (valores em dias) de ratas tratadas com itraconazol (IT),  $\beta$ - glucana (Beta), associação de  $\beta$ -glucana com duas diferentes doses de itraconazol (DT e DT5x) e Controle Negativo.

Indicador	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 $\pm$ 0,07	2,5 $\pm$ 0,06	2,4 $\pm$ 0,07	2,4 $\pm$ 0,07	2,3 $\pm$ 0,1	0,063
Aparecimento da penugem	4 $\pm$ 0,07	4,1 $\pm$ 0,05	4,2 $\pm$ 0,08	4,1 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,1	0,5734
Início de erupção de incisivos	7,5 $\pm$ 0,11	7,4 $\pm$ 0,07	7,4 $\pm$ 0,08	7,2 $\pm$ 0,07	7,3 $\pm$ 0,12	0,1457
Aparecimento dos pelos	7,3 $\pm$ 0,07	7,3 $\pm$ 0,05	7,1 $\pm$ 0,05	7,1 $\pm$ 0,05	7,8 $\pm$ 0,1*	< 0,0001
Abertura dos olhos	13,7 $\pm$ 0,12	13,5 $\pm$ 0,07	13,8 $\pm$ 0,13	13,4 $\pm$ 0,12	13,6 $\pm$ 0,11	0,0759
Descida dos testículos	15,6 $\pm$ 0,16	15,7 $\pm$ 0,2	15,4 $\pm$ 0,13	15,9 $\pm$ 0,17	16,7 $\pm$ 0,52*	0,012
Abertura vaginal	34,1 $\pm$ 0,5	34,6 $\pm$ 0,31	35,6 $\pm$ 0,59	33,6 $\pm$ 0,52	36,8 $\pm$ 0,38*	0,0022
Separação prepucial	36,8 $\pm$ 0,26	37,7 $\pm$ 0,22	37,7 $\pm$ 0,30	37,8 $\pm$ 0,40	37,3 $\pm$ 0,24	0,1154

\*diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (ANOVA/Dunnet). Média  $\pm$  epm.

## 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<sup>-1</sup>) 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 e o grupo controle. É interessante notar que as anormalidades esqueléticas encontradas no presente estudo não correspondem àquelas descritas por Tiboni *et al.* [33], 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 pode indicar variação da linhagem de ratos [7]. Contudo, observou-se aumento estatisticamente significativo da frequência destas variações

anatômicas nas doses mais elevadas de itraconazol, sendo também indicativo do potencial teratogênico.

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. [13,20]. Muitas das funções do retinol 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 [29]. O ácido retinóico é gerado nos tecidos fetais, com a utilização do retinol fornecido maternalmente [19]. É possível que ocorra inibição de outras enzimas ligadas ao citocromo P450 no embrião e que interfiram no desenvolvimento do mesmo [13], produzindo diferenças de alterações morfológicas entre os diversos azóis.

Doses elevadas de itraconazol demonstraram interferir na 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 pode estar relacionada aos machos submetidos ao mesmo tratamento, e que apresentaram alterações nos seus índices reprodutivos [31]. 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, semelhan-



te ao descrito para o cetoconazol [11]. Em humanos, já foram determinadas algumas funções da placenta que são consideradas críticas para o feto: adequada invasão dos trofoblastos; aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário; transporte de nutrientes da mãe para o feto; e a produção e transferência de hormônios reguladores do crescimento [23]. Assim, a potencial interferência dos antifúngicos azóis na morfologia ou na função placentária pode ocasionar alterações no crescimento e no desenvolvimento dos fetos.

A alta ocorrência de reabsorções e a morte fetais, assim como a menor massa corporal ao nascer, são indicativos de embriotoxicidade [7]. A perda pós-implantação foi significativamente maior nos animais tratados com  $\beta$ -glucana. 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 [9], o que pode explicar os resultados, visto que a  $\beta$ -glucana pode aumentar a atividade de células NK [27]. Ainda é possível evidenciar que doses elevadas de itraconazol também contribuíram para o aumento das perdas pós-implantação, relacionado, possivelmente, à sua ação como desregulador endócrino. A diferença observada na massa corporal dos filhotes ao nascer de cesárea pode indicar embriotoxicidade 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 natalidade e número de filhotes por ninhada, fica evidente a embriotoxicidade do itraconazol nas doses de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tanto a embriotoxicidade como a capacidade teratogênica do itraconazol em ratos estão de acordo com as informações fornecidas na bula do produto de referência, que descreve tais efeitos em doses de  $40\text{-}160 \text{ mg.kg}^{-1}$  [30].

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 [6,24] 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 materna podem influenciar negativamente os indicadores reprodutivos e o desenvolvimento embrionário [26]. No presente estudo foi observado menor ganho de massa corporal durante a gestação nas ratas do grupo tratado com 10 vezes a dose terapêutica de itraconazol em associação com a  $\beta$ -glucana, contudo não foi observada 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 [34]. Não foram evidenciados sinais de toxicidade sistêmica materna, tais como sinais clínicos, diminuição da massa corporal, diminuição do consumo de água e ração, mortalidade ou alterações em órgãos [5]. 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, influenciando o desenvolvimento neurocomportamental dos filhotes [3]. De forma inversa também o estímulo tátil na região ventral materna pelos filhotes é requerida para que a mãe assuma a postura arqueada e imobilidade durante amamentação [32]. A associação de  $\beta$ -glucana e itraconazol não demonstrou afetar o comportamento materno, mesmo em doses de itraconazol cinco vezes maiores que as terapêuticas. É importante considerar que o baixo número de partos nos grupos com maior dose de itraconazol limita as inferências de alguns parâmetros.

A exposição da mãe à dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  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 desenvolvimento. Os azóis podem, potencialmente, interferir na síntese de esteróides, por ação no citocromo P450, inibindo a biossíntese de estrógenos e andrógenos. Alguns azóis também demonstraram inibição dos receptores andrógenos e estrógenos [17]. Apesar do atraso da abertura vaginal e descida dos testículos, não foram observadas lesões em órgãos analisados por histopatologia, diferenças significativas nos parâmetros espermiáticos ou na concentração sérica de testoste-

rona nos filhotes machos na puberdade. Em machos tratados com a mesma associação, foram observados efeitos funcionais sobre a fertilidade, relacionadas principalmente ao desequilíbrio hormonal [31]. É possível que as dosagens mais elevadas de itraconazol na associação causem alteração no comportamento sexual nos filhotes, pois agiria como desregulador endócrino durante o desenvolvimento da libido, contudo, devido ao pequeno número de animais nascidos nos grupos com doses mais elevadas de itraconazol, não foi possível confirmar a hipótese.

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 [1]. 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 [28]. Os tratamentos utilizados não demonstraram efeitos sobre a ansiedade.

A dose de  $\beta$ -glucana e itraconazol utilizado em associação neste estudo já demonstrou sua eficácia terapêutica [21]. A maioria dos efeitos observados pode ser explicada pela ação do itraconazol. Outros autores relatam que a  $\beta$ -glucana diminui os efeitos nos fetos da exposição materna à ciclofosfamida, principalmente relacionados à viabilidade e às perdas pós-implantação [25]. 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 [2]. Em doses terapêuticas associação de  $\beta$ -glucana e itraconazol não demonstrou desenvolver nenhuma destas interações.

Os resultados 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.

#### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Prati-Donaduzzi. Toledo, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório Hebron Farmacêutica. Caruaru, PE, Brazil.

**Funding.** This research was supported by CNPq.

**Ethical approval.** Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/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 Altman J. & Sudarshan K. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*. 23(4): 896-920.
- 2 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. 29-38.
- 3 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.
- 4 Azevedo M.S. 2005. Efeitos de intervenção no ambiente neonatal sobre a relação mãe e o comportamento dos ratos na idade adulta. 85f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 5 Chahoud I., Ligensa A., Dietzel L. & Faqi A.S. 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reproductive Toxicology*. 13(5): 375-381.

- 6 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.
- 7 Amaral C.V.S. & Nunes Junior G.P. 2008. Ketoconazole and fluconazole-induced embryotoxicity and skeletal anomalies in Wistar rats: a comparative study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(6): 1153-1161.
- 8 Dallegrave E. 2003. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato - Roundup em ratos Wistar. 200f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 9 Dosiou C. & Giudice L.C. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews*. 26 (1): 44-62.
- 10 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.
- 11 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(11): 1179-1184.
- 12 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  $\beta$ -glucan. *International Journal of Dermatology*. 53(3): e168-e170.
- 13 Giavini E. & Menegola E. 2010. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicology Letters*. 198(2): 106-111.
- 14 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(2): 49-61.
- 15 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(3): 439-445.
- 16 King C.T., Rogers P.D., Cleary J.D. & Chapman S.W. 1998. Antifungal therapy during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*. 27(5): 1151-1160.
- 17 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.
- 18 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(4): 139-45.
- 19 Manolescu D.C., El-Kares R., Lakhali-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(6): 598-602.
- 20 Marotta F. & Tiboni G.M. 2010. Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 6(4): 461-482.
- 21 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.
- 22 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(1): 105-109.
- 23 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(2): 141-169.
- 24 OECD. 2011. Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, n.443, 25p. Guideline for the testing of chemicals. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1378682090&id=id&accname=guest&checksum=6328A2B4F8C52D0FB9C726DCBFEB71BE>>. [Accessed online 09/2013.]
- 25 Oliveira R.J., Matuo R., Silva A.F., Matiazi H.J., Montovani M.S. & Ribeiro L.R. 2007. Protective effect of  $\beta$ -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.
- 26 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(13-14): 944-951.

- 27 **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(5): 557-564.
- 28 **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(1-3): 3-33.
- 29 **Ross S.A., McCaffery P.J., Drager U.C. & De Luca L.M. 2000.** Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews*. 80(3): 1021-1054.
- 30 **Sporanox. 2012.** Product Information, Janssen Pharmaceutica. 33p. Disponível em: <<http://www.janssenpharmaceuticalsinc.com/assets/sporanox.pdf>>. [Accessed online 12/2013.]
- 31 **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.
- 32 **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(5): 993-1011.
- 33 **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(1): 8-18.
- 34 **Tyl R.W. 2012.** Commentary on the role of maternal toxicity on developmental toxicity. Birth Defects Research. Part B. *Developmental and Reproductive Toxicology*. 95(3): 262-266.
- 35 **Vallano A. & Arnau J.M. 2009.** Antimicrobianos y embarazo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(9): 536-542.

