

ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS EFEITOS PROVOCADOS POR ANTIFÚNGICOS DERIVADOS DE AZÓIS (CETOCONAZOL E FLUCONAZOL) EM FÍGADO DE *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae)

JOSÉ CARLOS ELOI DE QUEIROZ*

JULIANA GONZAGA DE OLIVEIRA**

Resumo: Até a década de 40, havia relativamente poucos agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Através de pesquisas, descobriram-se novos medicamentos mais eficazes e menos prejudiciais à saúde dos pacientes. Os primeiros antifúngicos desenvolvidos foram os polienicos como a Anfotericina B que representou um grande avanço no tratamento de doenças fúngicas, entretanto é um medicamento que apresenta grandes efeitos colaterais. A seguir, foram criados novos antifúngicos derivados dos azóis, primeiro os imidazois, como o Cetoconazol, que por mais de uma década foi considerado a droga de escolha no tratamento prolongado de micoses endêmicas. Por fim, foram criados os triazóis, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, que apresentaram uma atividade antifúngica de amplo espectro e tiveram uma melhoria no perfil de segurança comparada com a Anfotericina B e o Cetoconazol. Este estudo teve com objetivo avaliar o efeito hepatotóxico das diferentes formas de apresentação medicamentosa, Marca Similar, Genérico e Manipulado dos antifúngicos Cetoconazol e Fluconazol. Após a administração das drogas, fígados de roedores *Calomys callosus* foram processados rotineiramente em parafina para análise histológica e corados com Hematoxilina e Eosina. Os resultados demonstraram que nenhuma das formas medicamentosas apresentaram efeito hepatotóxico quando observadas as doses terapêuticas. Estes resultados nos permitem concluir que doses terapêuticas dos antifúngicos Cetoconazol e Fluconazol não representam risco potencial para saúde dos pacientes e que mesmo as diferentes formas de apresentação medicamentosa não interferem no efeito hepatotóxico estando todas adequadas para o uso terapêutico humano.

Palavras chaves: Cetoconazol. Fluconazol. Injúria Hepática.

1 INTRODUÇÃO

Até os anos 40, relativamente poucos agentes antifúngicos estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. O progresso no desenvolvimento de novos antifúngicos está atrasado em comparação com a pesquisa antibacteriana, um fato que pode ser explicado por dois fatores. Primeiro, antes da era HIV (Human Immunodeficiency Virus), a ocorrência de infecções fúngicas era muito baixa para justificar grandes pesquisas

*Estudante de graduação do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Patos de Minas

**Professora Adjunta do Centro Universitário de Patos de Minas e orientadora da pesquisa-
julianago@unipam.edu.br

pela indústria farmacêutica. Segundo, a “aparente” falta de um alvo fúngico altamente seletivo, não presente em outras células eucarióticas (incluindo mamíferos), impedia o desenvolvimento de novos agentes (MAERTENS, 2004).

O desenvolvimento de antifúngicos polienos representou um grande avanço na micologia médica. A partir daí, a Anfotericina B se tornou rapidamente o condutor principal da terapia de infecções fúngicas, pois este agente interfere na integridade funcional e estrutural da membrana plasmática fúngica destruindo este microrganismo. Mas o uso deste medicamento foi associado com efeitos colaterais como nefrotoxicidade dose dependente. Pesquisas para novos antifúngicos e de baixa toxicidade levou à descoberta dos azóis várias décadas depois. Antifúngicos azóis são divididos nos imidazóis (Miconazol e Cetoconazol) e nos triazóis (Itraconazol, Fluconazol e Voriconazol). O último grupo tem três átomos de nitrogênio no anel azol enquanto o primeiro grupo apresenta apenas dois. Todos os azóis operam uma via comum no modo de ação: eles previnem a síntese de ergosterol, um componente da membrana plasmática do fungo, através da inibição da enzima esterol 14 α - desmetilase, um sistema enzimático microssomal dependente do citocromo P450. A rede de efeitos é uma inibição no crescimento e replicação fúngica (HARDMAN & LIMBIRD, 1996; COMO & DISMUKERS, 1994).

Cetoconazol, um derivado dos imidazóis sintetizado e desenvolvido pela Jansen Farmacêutica, foi o primeiro antifúngico dos azóis disponível para o tratamento oral de infecções fúngicas sistêmicas. Seu uso foi liberado em 1981 pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos e, por mais de uma década, foi considerado a droga de escolha no tratamento de micoses endêmicas (DROUHET & DUPONT, 1980).

Com o uso mundial do Cetoconazol, passou a existirem numerosos casos documentados de hepatite induzida por este medicamento (BRUSKO & MARTEN, 1991). Pacientes com repetições no tratamento com Cetoconazol apresentaram um aumento da hepatotoxicidade (CAUWENBERGH, 1989). Muitos relatos indicam níveis altíssimos de danos hepáticos chegando à necrose de nível três (BENSON et al., 1988).

Deste modo, o baixo padrão de resposta e freqüentes recorrências das grandes infecções fúngicas, assim como a toxicidade associada com a terapia do Cetoconazol induziu a pesquisas para um segundo grupo químico de derivados de azóis, denominado de triazóis. Em geral os triazóis demonstram um amplo espectro na atividade antifúngica e toxicidade reduzida quando comparados com os imidazóis.

Fluconazol, um antifúngico triazólico de amplo espectro desenvolvido pela Pfizer e aprovado para uso no início dos anos 90, cobre muitas das falhas dos imidazóis. Em contraste ao Cetoconazol, o Fluconazol é altamente solúvel em água e pode ser administrado intravenoso em pacientes com doenças graves (BRAMMER et al., 1990).

Apesar de ser uma droga relativamente segura, pois não interfere na síntese de testosterona e cortisol, existem relatos de necrose hepática fatal relacionadas com tratamento com Fluconazol e de hepatotoxicidade causada por recorrência no tratamento além de ser dose dependente (WELLES & LEVER, 1992; GRANT & CLISSOLD, 1990; BODEY, 1992).

Devido aos muitos casos documentados de hepatotoxicidade causadas por derivados de azóis e pelo seu importante uso no tratamento de infecções mitóticas e câncer de próstata, investigações dos mecanismos de hepatotoxicidade podem fornecer informações essenciais na pesquisa de outros derivados de azóis, que sejam efetivos, porém que causem menos efeitos colaterais.

O presente estudo teve como objetivo verificar, através de análise morfológica, a toxicidade dos antifúngicos Cetoconazol e Fluconazol em fígados de *Calomys callosus* após a administração por via oral de dose única desses medicamentos em diferentes formas de apresentação medicamentosa disponíveis no mercado, Marca comercial, Similar, Genérico, Manipulado.

2 Material e métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 27(vinte e sete) roedores, machos, com peso aproximadamente de 42 gramas da espécie *Calomys callosus*. Os animais foram mantidos no biotério do Centro Universitário de Patos de Minas, onde receberam água e alimento “Ad Libitum”.

2.2 Medicamentos

Foram utilizados dois medicamentos derivados de azóis, Cetoconazol e Fluconazol em dose terapêutica, (gentilmente doados pela Farmácia Universitária da Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Patos de Minas – MG). Os medicamentos foram divididos em grupos: Marca comercial, Similar, Genérico e Manipulado.

2.3 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em nove grupos de três animais para cada um dos medicamentos (Cetoconazol e Fluconazol). O primeiro grupo, o grupo controle, recebeu apenas o diluente (salina); os demais grupos foram distribuídos de acordo com o tipo de medicamento: Marca comercial, Similar, Genérico e Manipulado.

Os animais foram deixados em jejum por 24 horas e em seguida receberam dose única por via oral de Cetoconazol 200mg/70Kg e Fluconazol 150mg/70kg, convertidas para os pesos dos animais. Após 30 horas, os animais foram anestesiados com Éter Etílico e, em seguida, realizou-se o deslocamento cervical. O órgão de estudo, fígado, foi retirado e colocado imediatamente em solução fixadora (Formol Tamponado a 10% em Tampão Fosfato), onde permaneceu por 24 horas.

2.4 Análise histológica

Após a fixação do material, este foi transferido para o álcool 70% em água destilada e mantido a 4°C até o momento do processamento. Os materiais então foram desidratados em bateria de concentrações crescentes de Álcoois (80, 85, 95 e 100%), diafanizados em Xilol, e embebidos em parafina. Foram realizados cortes de 6µm de espessura em micrótomo de parafina (ANCAP) e, em seguida, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de Álcoois (100, 95, 85, 80 e 70%), corados em Hematoxilina e Eosina, desidratados novamente e montados sob lamínula quando foram analisados em Microscópio de Luz (NIKON).

3 Resultados e discussão

A análise microscópica dos cortes histológicos dos fígados dos *Calomys callosus* tratados com Cetoconazol e Fluconazol (Marca comercial, Similar, Genérico e Manipulado) demonstrou que não houve alteração hepática em relação ao grupo controle.

Rodrigues e Costa (1995), utilizando hepatócitos de ratos em cultura, verificaram que o Cetoconazol é diretamente tóxico para células de fígado independente da dose e do

tempo de uso. No presente estudo, não se observou qualquer dano que indicasse hepatotoxicidade gerada pelo uso em dose única do Cetoconazol (200mg) (Figura 1), sugerindo que dose única e em quantidade adequada deste medicamento não gera injúria hepática em animais experimentais. Entretanto, estes resultados não afirmam que freqüentes ou super doses deste medicamento não venham a desencadear lesões hepáticas, uma vez que o estudo avaliou apenas dose única e terapêutica dos medicamentos.

Como em alguns casos clínicos de infecções micóticas sistêmicas, os pacientes necessitam fazer uso de antifúngicos, como, por exemplo, o Cetoconazol, por até sete dias ou mais. Isso pode representar um risco para saúde dos pacientes. Yue Ming et al. (2003), em seu estudo analisando fígado de coelhos, verificou que doses únicas de 40mg/kg de Cetoconazol, o equivalente a 800mg em humanos, ou seja, quatro vezes a dose terapêutica resultou um efeito hepatotóxico. Eles também verificaram que a hepatotoxicidade induzida pelo Cetoconazol não está relacionada apenas com a dose, mas também com o nível de transaminase no soro e que o perfil tempo/concentração após a ingestão oral do medicamento apresentou resultados significantes.

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com Fluconazol (150mg) também não apresentou alterações morfológicas, independente das apresentações medicamentosas: Marca comercial, Similar, Genérico e Manipulado (Figura 2).

A ausência de danos hepáticos nos animais tratados com Fluconazol pode ter ocorrido pelo fato de este medicamento ser um novo derivado de azóis recentemente produzido sendo, portanto, menos hepatotóxico que o Cetoconazol (GRANT & CLISSOLD, 1990; TRUJILHO et al., 1994). Entretanto, o uso prolongado desse medicamento pode representar um risco potencial para saúde dos pacientes, pois já foram relatados casos de hepatite e necrose hepática induzidas por retratamento com Fluconazol. (WELLES & LEVER, 1992; GRANT & CLISSOLD, 1990; BODEY, 1992).

4 CONCLUSÃO

Este estudo nos permitiu concluir que a administração via oral de dose única dos medicamentos Cetoconazol (200mg) e Fluconazol (150mg) não representou risco potencial para a integridade hepática em animais experimentais. E as diferentes formas de apresentação medicamentosa desses antifúngicos disponíveis no mercado, Marca comercial, Similar, Genérico e Manipulado, não demonstraram qualquer dano hepático dentro das condições de uso estabelecidas.

5 Agradecimentos

Nossos agradecimentos às professoras do curso de farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde e farmacêuticas responsáveis pela Farmácia Universitária do UNIPAM, Helen Carla Caixeta e Ms. Ana Paula Nascentes de Deus Fonseca, pela assistência técnica e manipulação dos medicamentos. E ao professor Dr. Julio César Nepomuceno, pela confecção das fotografias no microscópio do Laboratório de Citogenética do UNIPAM.

6 REFERÊNCIAS

BENSON, G. D.; ANDERSON, P. K.; COMBES, B. and ISHAK, K. G. Prolonged jaundice following ketoconazole-induced hepatic-injury. **Diagnostic disease Science**, **33**: 240-246, 1988.

BODEY, G. P. Azole antifungal agents. **Clinical Infection Diseases**, **14(suppl.)**, S161-S169, 1992.

BRAMMER, K. W.; FARROW, P. R. and PAULKNER, J. K. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. **Review Infection Diseases**, **12(Suppl. 3)**: 318-326, 1990.

BURSKO, C. S. and MARTEN, J. T. Ketoconazole hepatotoxicity in a patient treated for environmental illness and systemic candidiasis. **Annual Pharmacotherapy**, **25**: 1321-1325, 1991

CAUWENBERGH, G. Safety aspects of ketoconazole, the most commonly used systemic antifungal. **Mycoses**, **32(Suppl.2)**: 59-63, 1989.

COMO, J. A. and DISMUKES W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **N England Journal Medicine**, **330**: 263-271, 1994.

DROUHET, E. and DUPONT, B. Chronic mucocutaneous candidosis and other superficial and systemic mycoses successfully treated with ketoconazole. **Review of Infection Diseases**, **2**: 606-619, 1980.

GALGANI, J. N.; STEVENS, D. A.; GRAYBILL, J. R.; DISMUKES, W. E.; CLOUD, G. A. and (NIAID MYCOSES STUDY GROUP). Ketoconazole therapy of progressive coccidioidomycosis: comparison of 400- and 800-mg doses and observations at higher doses. **American Journal of Medicine**, **84**: 603-610, 1988.

GRANT, S. M. and CLISSOLD, S. P. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potencial in superficial and systemic micoses. **Drugs**, **39**: 877-916, 1990.

HARDMAN, J. G. and LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: **Mac Graw-Hill, Interamericana**, 1996.

HEERES, J.; BACKX, L. J.; MOSTMANS, J. H. and VAN CUSTEM, J. Antimycotic imidazoles. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a anew potent orally active broad-spectrum antifungal agent. **Journal of Medicine Chemical**, **22**: 1003-1005, 1979.

LEWIS, J. H.; ZIMMERMAN, H. J.; BENSON, G. D. and ISHAK, K. G. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. **Gastroenterology**, **86**: 503-513, 1984.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **10(Suppl. 1)**: 1-10, 2004.

MAERTENS, J. and BOOGAERTS, M. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. **Current Pharmaceutical Des.**, **6**: 225-239, 2000.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DESEASES MYCOSES STUDY GROUP. Treatment of blastomycosis and histoplasmosis with ketoconazole. Results of a prospective randomized clinical trial. **Annal International Medicine**, **103**: 861-872, 1985.

RESTREPO A.; GOMEZ, I. and CANO, L. E. Treatment of paracoccidioidomycosis with ketoconazole: a trhee-year experience. **American Journal of Medicine**, **74(Suppl. 1B)**: 48-52, 1983.

RODRIGUEZ, R. J. and ACOSTA, D. Jr. Comparison of Ketoconazol- and fluconazole-induced hepatotoxicidade in a primary culture system of rat hepatocytes. **Toxicology**, **96**: 83-92, 1995.

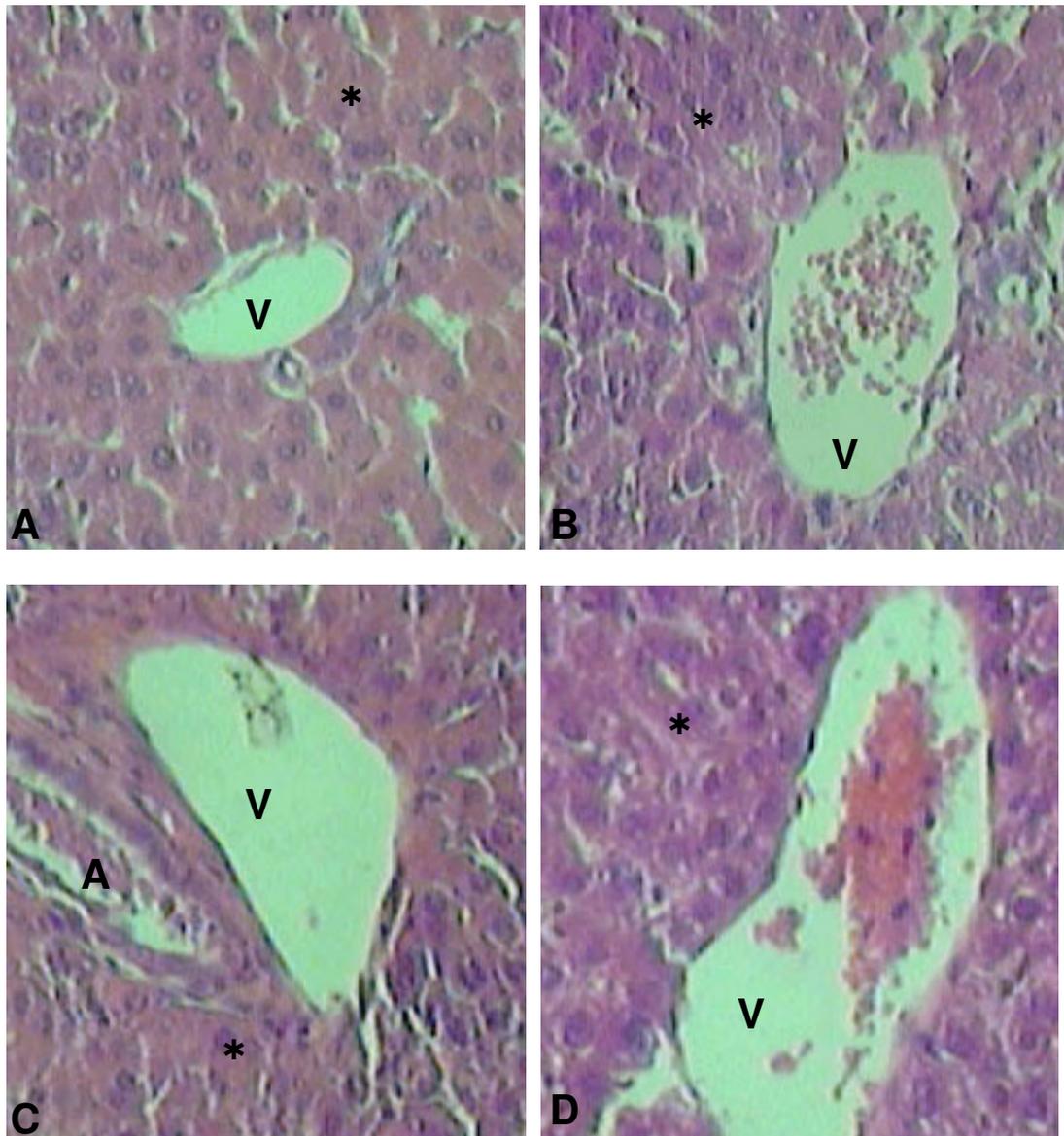
TRUJILLO, M. A.; GALGIANI, J. N. and SAMPLINER, R. E. Evaluation of hepatic injury arising during fluconazole therapy. **Archives International Medicine**, **154**: 102-104, 1994.

YUE-MING, M.; ZHANG-QING, M.; CHAN-QING, G.; JIAN-SHE, Y. and RUI-YUAN, S. Hepatotoxicity and toxicokinetics of ketoconazole in rabbits. **Acta Pharmacologica**, **24(8)**: 778-782, 2003.

WELLS, C. and LEVER, A. M. L. Dose dependent fluconazole hepatotoxicity proven on biopsy and rechallenge. **Journal of Infection**, **24**: 111-112, 1992.

ANEXOS

Figura 1- Fotomicrografia de fígado de *Calomys callosus* tratados com Cetoconazol (200mg) corados com Hematoxilina e Eosina. A- Controle; B- Marca comercial; C- Similar; D- Genérico; E- Manipulado. V: Veia Centro Lobular; (*) Hepatócitos; A: Artéria hepática. 100X



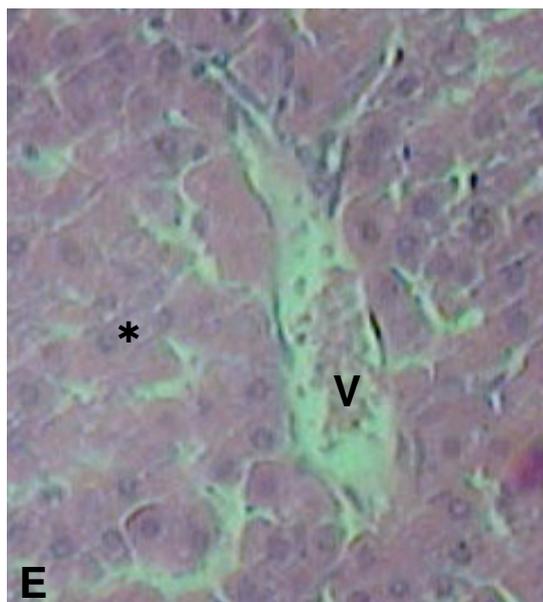


Figura 2- Fotomicrografia de fígado de *Calomys callosus* tratados com Fluconazol (150mg) corados com Hematoxilina e Eosina. A- Controle; B- Marca comercial; C- Similar; D- Genérico; E- Manipulado. V: Veia Centro Lobular; (*) Hepatócitos. 100X

