

## AÇÃO TERATOGENICA DO FLUOTANO NO RATO (\*)

DR. PEDRO GERETTO, E.A.

AP 2141

*Foram estudados 41 pares de ratas, sendo a metade submetida a anestesia pelo fluotano e 41 outras que serviram de controle, após acasalamento. Escolheu-se o 6.º, 8.º, 10.º, 12.º e 14.º dia de prenhez para a anestesia da rata, por corresponder as fases de início de diferenciação celular do concepto e o início da organogênese. Este período é o mais susceptível a ação de agentes teratogênicos. Os resultados mostraram: malformações de cauda, coluna vertebral e parede anterolateral do tórax. Aumento do índice mitótico das células dos somitos e do tubo neural. Observou-se também aumento do índice de mortalidade e menor desenvolvimento nas crias das ratas que receberam anestesia com Fluotano.*

Embora exista grande suspeita, de que os agentes anestésicos exerçam ação teratogênica, ainda não se pode ter uma comprovação clínica deste fato. Mesmo não se podendo extrapolar uma experimentação, a importância de testes para avaliar a ação teratogênica de drogas antes de sua utilização em clínica, tem sido ressaltada por Cahen<sup>(8)</sup> e Wilson<sup>(39)</sup>.

Após os trabalhos de Gregg<sup>(15)</sup> em 1941, na Austrália, chamando a atenção para a ação teratogênica da rubeóla, e a tragédia da Thalidomide, na Europa, relatada por Lenz e Knapp<sup>(22)</sup>, um grande interesse sobre o problema das malformações foi despertado, entre os pesquisadores, e um número cada vez maior de drogas tem sido testado, para a avaliação de sua teratogenicidade. McIntosh e col.<sup>(24)</sup>, em estudo realizado em 5.964 parturientes e 5.739 recém-nascidos, encontraram uma incidência de 7,5% de malformações congênitas. Child e col.<sup>(9)</sup>, estudando 40.000 gestantes, verificaram, que 0,3% apresentaram uma intercorrência cirúrgica não obstétrica, durante a gravidez.

(\*) Parte da Tese de Doutorado apresentada à Escola Paulista de Medicina — São Paulo — 1971.

Se analisarmos estes dados, podemos aquilatar do risco que os anestésicos podem representar como causa de malformações.

No entanto, desde o primeiro trabalho experimental de Storkard <sup>(37)</sup> em 1910, decorreram mais de cinqüenta anos, até que Parbrook <sup>(25)</sup> chamasse a atenção, para a ação teratogênica do protóxido de azoto, sobre o embrião de galinha. Desde então, um pequeno número de pesquisadores, tem se preocupado em estudar a ação teratogênica dos agentes anestésicos.

Interessados no assunto desde 1966 <sup>(14)</sup>, observamos e estudamos 62 ratas prenhes. A metade foi anestesiada pelo fluotano nos 6.<sup>o</sup>, 8.<sup>o</sup>, 10.<sup>o</sup>, 12.<sup>o</sup> e 14.<sup>o</sup> dias de prenhez e as demais mantidas como grupo controle. Foram analisadas as crias de ambos os grupos, quanto às malformações aparentes, mortalidade, curva de peso e desenvolvimento. Os resultados demonstraram alta incidência de malformações localizadas na cauda; ausência de segmentos da coluna toracolombar; pelos eriçados e mal sedosos. Foram, ainda, constatadas, além dessas, outras malformações localizadas na cabeça e tórax. A mortalidade, bem como a curva de peso e o desenvolvimento nas crias das fêmeas anestesiadas, demonstraram, em relação ao grupo controle, resultados altamente significativos.

Basford e col. <sup>(4)</sup> em seu trabalho concluíram que o fluotano parece ser teratogênico em ratos variando o grau de dano de acordo com a concentração e a duração da exposição durante o período de susceptibilidade. "Embora uma extrapolação direta destes elementos para a espécie humana seja injustificada, este estudo sugere a necessidade de investigações futuras do potencial teratogênico dos agentes anestésicos gerais."

#### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos em nossa experimentação ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, oriundas do nosso biotério, pesando de 190 a 220 grs., em regime de alimentação normal e "ad libitum".

Acasalamos 41 pares de ratas, na proporção de duas fêmeas para cada macho. O teste de prenhez foi feito pela técnica de Hamilton e Wolfe <sup>(17)</sup>. Uma vez formado o par de ratas prenhes, realizamos um sorteio recebendo uma rata a letra A e a outra a letra B, sendo colocadas em gaiolas individuais. Os pares foram numerados de P1 a P41 para A e P1 a P41 para B, sendo que as do grupo A receberam anestesia pelo fluotano e as do grupo B constituíram nosso

grupo de controle. Os acasalamentos foram feitos entre 17 e 18 horas e os testes de prenhez entre 7 e 8 horas. O dia em que o teste revelou-se positivo, foi considerado o dia zero, para a contagem do tempo de prenhez.

Para analisar a presença de malformações, a curva ponderal, a mortalidade, o índice mitótico e a porcentagem de metáfases do tubo neural e do sômito das crias, cujas mães foram anestesiadas pelo fluotano, comparamos estes resultados do grupo A com os resultados do grupo B, mantidos nas mesmas condições ambientais e de alimentação, evitando outros fatores que pudessem influir sobre os resultados, a não ser o tratamento que um dos grupos (A) recebeu.

Nenhum dos animais recebeu medicação pré-anestésica. As ratas foram anestesiadas em um recipiente de "pirex", especialmente construído, com dois orifícios: um superior por onde entrou uma mistura de 1 litro de oxigênio com concentração de halotano de 2,5 e 3,5%, fornecidas por um vaporizador "Fluotec Mark 2", e um, inferior, ligado a um tubo plástico que dava escape ao excesso da mistura e ao ar expirado. A concentração de 3,5% foi usada para indução da anestesia e 2,5% para manutenção. Nenhum dos animais apresentou complicações anestésicas e somente foram recolocados em suas gaiolas quando completamente acordados.

Nos animais de P1 a P31 dos grupos A e B, (nos quais estudamos as malformações, a curva ponderal e a mortalidade), os do grupo A foram anestesiados durante 30 minutos, contados a partir do momento em que deixavam de reagir a estímulos dolorosos (pinçamento da pele com uma pinça de Kelly), no 6.º, 8.º, 10.º, 12.º e 14.º dias de prenhez.

Para constatar as malformações, as gaiolas foram visitadas diariamente entre 7 e 8 e 17 e 18 horas, para verificação de partos. As crias encontradas eram retiradas das gaiolas, cuidadosamente examinadas a olho nú, e as que apresentavam malformações, foram separadas e fotografadas.

O estudo comparativo da mortalidade dos dois grupos (A e B) foi feito durante os primeiros quinze dias de vida. As gaiolas foram visitadas diariamente entre 7 e 8 horas e 17 e 18; as crias encontradas mortas eram retiradas, e este foi considerado o dia do óbito.

A curva ponderal das crias dos grupos A e B feita até o 15.º dia de vida, teve por finalidade avaliar o seu desenvolvimento. Pesamos cada ninhada diariamente entre 17 e 18 horas, dividindo o peso total da ninhada pelo número de crias, a fim de se obter o peso médio de cada cria de uma mesma ninhada.

Como nosso estudo era comparativo, esta pesagem só foi feita enquanto havia crias dos dois grupos. A pesagem foi feita com uma balança "Triple beam balance", com capacidade máxima de 2.610 grs. (dois mil, seicentos e dez gramas) e sensibilidade de 1 mg, sendo esta a unidade estabelecida.

Dividimos os pares P32 a P39 em dois grupos. P32 a P35; no sexto dia de prenhez, entre 17 e 18 horas, dissecamos a artéria femural, caterizamos com um tubo de polietileno, injetamos 05 mg de heparina e colocamos em dois recipientes de "pirex". No que estava a rata B introduzimos um fluxo de 1 litro de oxigênio por minuto e anestesiámos as ratas A, com halotano, durante 30 minutos. Antes de suspendermos a anestesia retiramos pelo catéter de ambas, uma amostra de sangue, que foi enviada ao laboratório de hemodinâmica, para determinar o teor da saturação de oxigênio. Com as do grupo P36 a P39, A e B, repetimos a mesma operação no 14.º dias de prenhez. A quantidade de sangue que conseguimos retirar de cada animal foi de 2 a 3 ml. O aparelho usado foi o oxímetro de "The Water Corporation", cuja curva foi previamente calibrada em um aparelho manométrico de Van Slyke.

Os pares P40 a P41 A e B foram utilizados para determinação do índice mitótico e porcentagem de metáfases do tubo neural e do sómito. As ratas do grupo A no 10.º dia de prenhez foram anestesiadas das 14,30 às 17,30 horas pelo halotano, sendo em seguida sacrificadas juntamente com as do grupo B, por esmagamento do crânio e os embriões retirados por laparotomia.

Todos os embriões foram fixados durante 24 horas em líquido de Bouin, incluídos em parafina, cortados em série, com a espessura de 5 micra e corados pela hematoxilina-eosina. Foram montadas 52 lâminas de P40 B, 46 de P41 B, 76 de P40 A e 92 de P41 A. Cortes transversais da porção caudal de 20 embriões foram separados para estudo, sendo 12 de P40 (6 de A e 6 de B), e 6 de P41 (4 de A e 4 de B). Em cada 3 cortes transversais alterados foram contados 200 nucleolos do tubo neural e 200 dos sómitos e em cada embrião contamos 1.000 núcleos de tubo neural e 1.000 núcleos de sómito, considerando-se as mitoses e as metáfases.

A contagem foi feita com microscópio Zeiss binocular, com objetiva 100 em imersão, e ocular 8 quadriculada, com um aumento final de 800 vezes. Para contagem dos núcleos os cortes dos embriões foram divididos ao meio e contados em cada corte 100 núcleos de tubo neural e 100 núcleos de sómito de cada lado. Como as lâminas foram montadas em cortes seriados com a espessura de 5 micra, contamos um em cada

três cortes, para evitarmos a superposição. Foram contados 48.000 núcleos (24.000 de tubo neural e 24.000 dos sómitos), sendo 20.000 por nós e 28.000 por outro observador (\*) alheio à divisão em grupos da nossa investigação. Dos 10 embriões por nós contados, 4 foram recontados pelo outro observador (1 de P40 A, 1 de P41 A e 1 de P40 B e 1 de P41 B).

O índice mitótico foi determinado pela fórmula (\*\*) —  $Im = (Nm/N) \times 100$ , considerando separadamente 10.000 núcleos do tubo neural e 10.000 do sómito de P40 A, 10.000 de P40 B, 10.000 de P41 A e 10.000 de P41 B. Os oito mil (8.000) núcleos recontados pelo outro observador foram utilizados apenas para estudo estatístico.

As porcentagens de metáfases, foram estudadas separadamente, para cada grupo, consideradas em relação ao n.º de mitoses e não em relação ao número de núcleos contados.

Para verificação da homogeneidade dos pesquisadores quanto à contagem das mitoses do tubo neural e sómitos dos grupos A e B, foram realizadas análises de variância. A mesma estatística foi aplicada para verificação da possível existência de regressão, quanto ao número de sobreviventes, no decorrer do tempo e também em relação ao peso médio das ninhadas.

Foi usado o teste da curva normal para verificação de uma possível diferença de comportamento entre a proporção de crias defeituosas, da saturação média de O<sub>2</sub> do sangue arterial e dos índices mitóticos de tubo neural e sómitos nos grupos A e B.

Para verificação de uma possível associação quanto à porcentagem de metáfases e outras fases de mitose nos grupos "A e B", tanto para sómitos quanto para tubo neural, usou-se o teste do Qui-quadrado.

Em todos os casos, o nível de significância usado para rejeição da hipótese de nulidade, foi igual ou menor de 5% ( $p \geq 0,05$ ).

## RESULTADOS

Dos 41 pares estudados, apenas 26 puderam ser considerados no capítulo de resultados e foram assim distribuí-

---

(\*) Dr. Reynaldo Ceil, residente da Disciplina de Anestesiologia da Escola Paulista de Medicina.

(\*\*) Nm = número total de mitoses contados

N = número total de núcleos contados

P1 a P5 experiência piloto; P8, P10, P13, P18, P22, P30, P31, A ou B, mesmo teste de prenhez sendo positivo, uma ou ambas as ratas não pariram; P9 A e B tentamos troca de ninhada; P17 A morreu no 17.º dia de prenhez e P25 sofreu um acidente no laboratório.

dos: 16 pares (P6, P7, P11, P12, P14, P15, P16, P17, P20, P21, P23, P24, P26, P27, P28, P29, A e B) para estudo das malformações, curva ponderal e mortalidade. O resultado percentual comparativo das malformações e mortalidade entre os grupos A e B, está expresso no gráfico 1; pares (P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, A e B), para determinar a saturação de oxigênio no sangue arterial e 2 pares (P40 e P41), para determinação do índice mitótico e porcentagem de metáfases de tubo neural e sómitos.

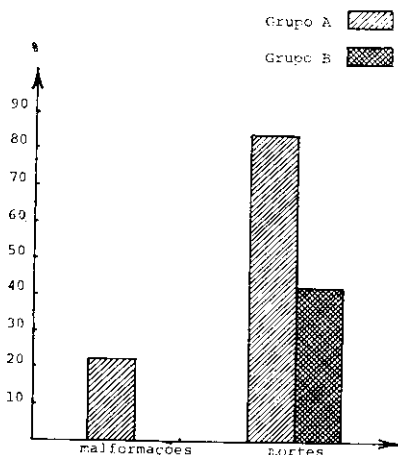


GRÁFICO 1

Porcentagem de malformações e mortes dos grupos A e B

*Malformações* — Na análise das malformações nos limitamos àquelas que puderam ser constatadas a um exame minucioso a olho nú e documentadas fotograficamente.

Dos 16 pares estudados, 10 ratas do grupo A deram 124 crias das quais 26 (21%) ao nascer, apresentavam malformações, sendo que uma mesma ninhada havia crias malformadas e outras aparentemente normais. As 127 crias das 16 ratas do grupo controle (B) eram todas aparentemente normais.

Em uma mesma ninhada encontramos crias malformadas, aparentemente normais e com tipos de malformações diferentes.

As malformações apresentadas foram: ausência parcial ou total de cauda, 23 (P6A, P11A, P14A, P20A, P21A, P23A,

P24A e P29A) — (Figura 1) ausência de segmento da coluna vertebral, 2 (P16A) (Figura 2) e malformações anterolateral do tórax e costelas, 1 (P6A) — (Figura 3).

Realizado o teste pela curva normal, para verificação de possível significância da não igualdade entre as proporções acima citadas encontramos um valor para  $z$  calculado igual a 5,60\*, que comparado com o  $z$  crítico 1,64, nos permitiu rejeitar a hipótese de igualdade entre as proporções observadas, sendo no nosso caso maior para o grupo "A".

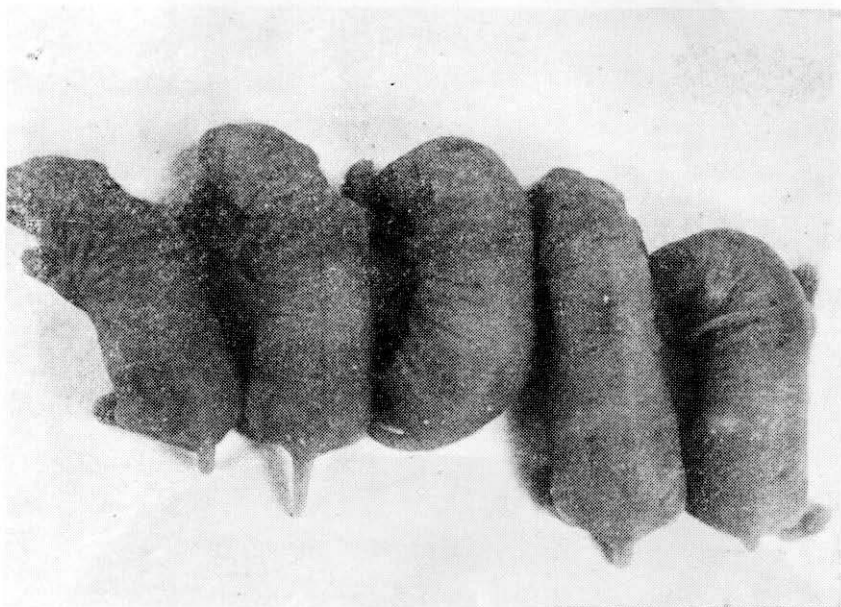


FIGURA 1

*Mortalidade* — A mortalidade comparada dos dois grupos (A e B) foi feita do dia zero (dia do nascimento até o 15.<sup>o</sup> dia (Gráfico 2).

Os resultados da mortalidade até o 9.<sup>o</sup> e 12.<sup>o</sup> dias foram submetidos à análise de variância, que mostrou haver regressão a linearidade para os dois grupos.

*Curva ponderal* — O resultado da curva ponderal, que foi feita para avaliar o desenvolvimento das crias de A e B, mostra o peso total das ninhadas. O número de animais de cada ninhada, o peso médio e a diferença de peso de cada animal, desde o nascer (dia zero) até o 15.<sup>o</sup> dia de

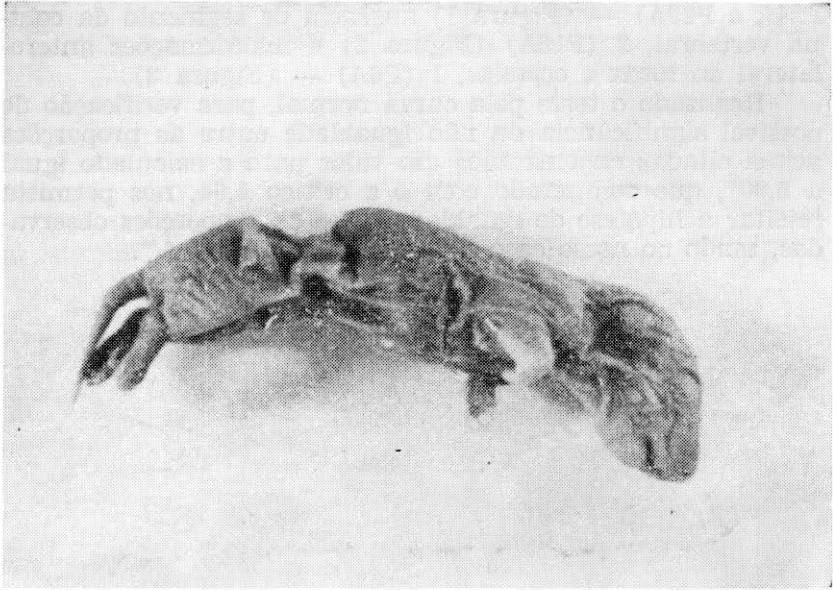


FIGURA 2

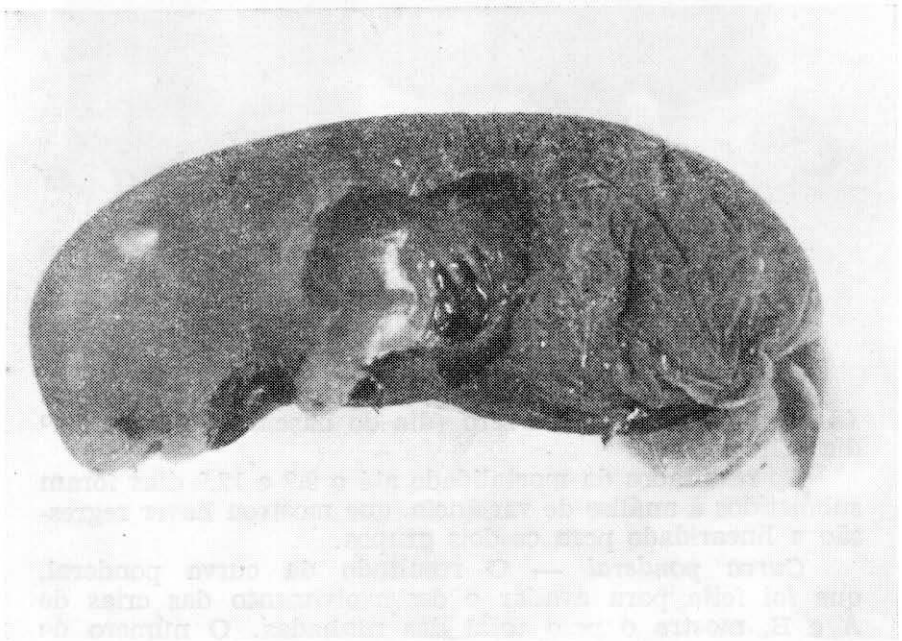


FIGURA 3



vida, está representado no Gráfico 3, que mostra um desenvolvimento ponderal, menor das crias de A em relação às crias de B até 9.<sup>o</sup> e 12.<sup>o</sup> dias.

A figura 4 mostra 2 crias; uma de P7A e outra de P7B, cujas mães tiveram testes de prenhez positivo no mesmo dia; filhas do mesmo pai, nascidas no mesmo dia e ambas no 15.<sup>o</sup> dia de vida, aparentemente normais, mostram uma nítida diferença de desenvolvimento.

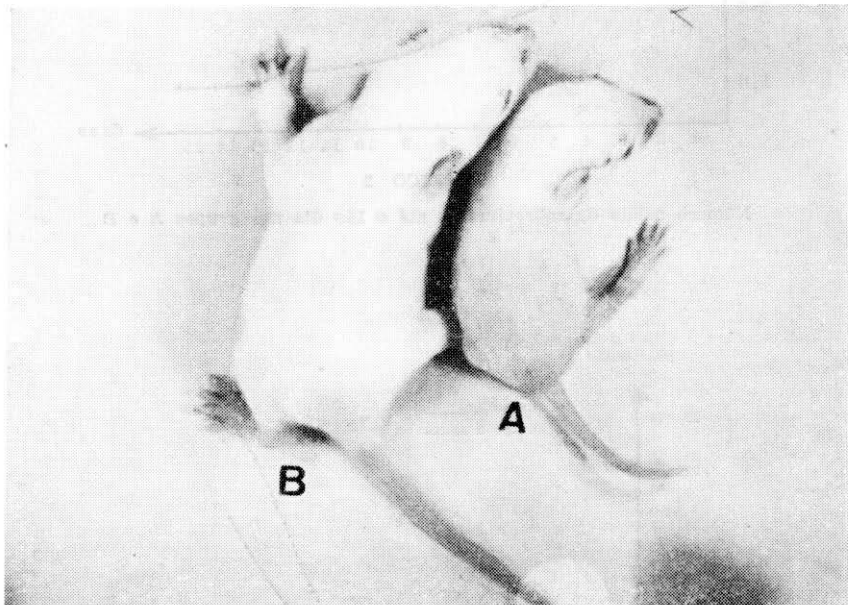


FIGURA 4

Os resultados dos pesos médios das crias dos grupos "A e B" foram submetidos à análise de variância até o 9.<sup>o</sup> e 12.<sup>o</sup> dias respectivamente, mostrando haver regressão e linearidade para os dois grupos.

*Determinação da saturação do oxigênio no sangue arterial*  
— O resultado do teor de saturação do oxigênio no sangue arterial no 6.<sup>o</sup> e 14.<sup>o</sup> dias de prenhez das ratas do grupo A e B mostrou não haver diferença significativa para as médias percentuais de saturação do oxigênio entre os grupos, não nos permitiram rejeitar a hipótese de igualdade entre as porcentagens para os dois grupos, nos dias considerados.

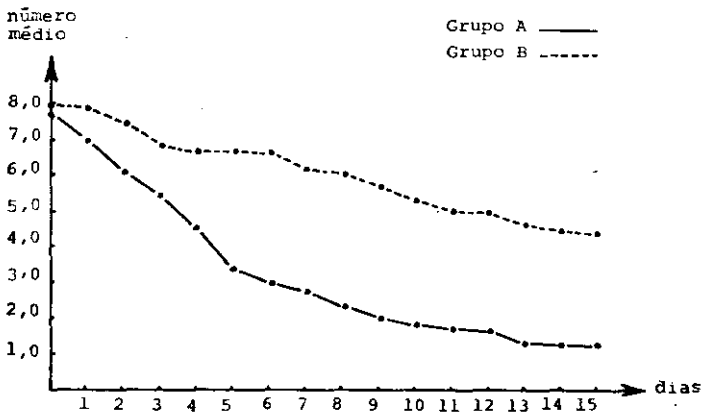


GRÁFICO 2

Número médio de sobreviventes até o 15.º dia nos grupos A e B

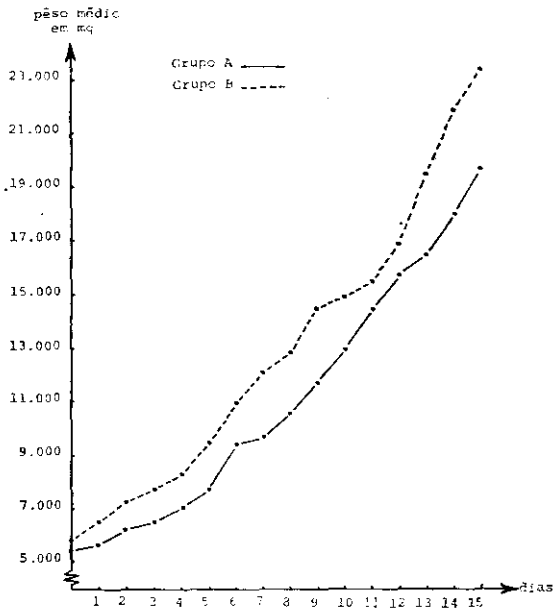


GRÁFICO 3

Peso médio de ninhadas (em miligramas) até o 15.º dia de vida nos grupos A e B

*Determinação do índice mitótico, e a porcentagem de metáfases do tubo neural e sómitos (fig. 5)*

Nestes resultados temos que considerar:

1. A contagem de 4.000 núcleos feita por nós e repetida pelo outro observador, a fim de averiguar a homogeneidade entre os observadores;
2. O número de mitoses contadas no tubo neural e sómitos pelos dois observadores nos grupos A e B;
3. O número de metáfases contados no tubo neural e sómitos dos grupos A e B;
4. O índice mitótico do tubo neural e sómitos dos grupos A e B.



FIGURA 5

Com a finalidade de se verificar se havia ou não homogeneidade entre os pesquisadores, realizou-se a estatística da análise de variância, que nos permitiu aceitar tal homogeneidade, ao nível crítico considerado. Em relação às porcentagens de metáfases, estudou-se o comportamento das mesmas para tubo neural e sómitos nos grupos A e B. Os resultados correspondem à porcentagem de metáfases do tubo neural e sómitos, respectivamente.

A estatística do Qui-quadrado mostrou que foi possível aceitar a hipótese de igualdade entre as porcentagens de metáfases no grupo A (31,54%) e do B (23,94%), no tubo neural, pois o Qui-quadrado calculado = 0,64 e o Qui-quadrado crítico =  $X^2_{1GL} = 3,84$ . A mesma estatística nos foi possível rejeitar a hipótese de igualdade entre as porcentagens de metáfases de A (24,41%) e de B = 11,09 e o Qui-quadrado crítico =  $X^2_{1GL} = 3,84$ .

Para verificar a possível diferença entre o índice mitótico dos grupos A e B, tanto para tubo neural como para sómitos, procedemos a um teste de proporções, que mostrou diferenças significantes entre os dois grupos, tanto para tubo neural como para sómitos.

#### DISCUSSÃO

O rato preenche as condições ideais de um animal de laboratório: tem sua morfologia, embiologia, genética e fisiologia bem conhecidas (<sup>39</sup>). Daí a escolha desse animal para toda a nossa experimentação, neste trabalho.

Não usamos pré-medicação anestésica nos animais, a fim de evitar ação de outras drogas, que não fosse a anestesia pelo fluotano, o qual atravessa a barreira plascentária (<sup>29</sup>), atuando diretamente sobre o concepto.

Os dias escolhidos 6.<sup>o</sup>, 8.<sup>o</sup>, 10.<sup>o</sup>, 12.<sup>o</sup> e 14.<sup>o</sup> de prenhez para anestesiarmos a rata, corresponde à fase de início da diferenciação celular do concepto, ao início da organogênese, sendo esse o período mais sujeito à ação dos agentes teratogênicos (<sup>37,38,39</sup>).

A concentração do anestésico usada foi a mínima necessária para manter o animal em um plano anestésico, no qual ele não reagia a estímulos externos nem dolorosos, sem provocar uma depressão respiratória, aparente, e cuja concentração é semelhante a de uso clínico.

Mesmo sabendo, que a saturação do oxigênio arterial não seja o método preciso para avaliação da hipóxia de hiper-capnia, usamos este meio, em virtude de dificuldades técnicas: embora saibamos, também, que o método ideal seria a dosagem do  $PO_2$  e  $PCO_2$  arterial e venoso. Estes resultados no entanto, servem para demonstrar que, durante a anestesia, tanto as ratas do grupo A como as ratas do grupo B tiveram a mesma saturação de oxigênio arterial, tanto no 6.<sup>o</sup> quando no 14.<sup>o</sup> dia de prenhez.

Como o fluotano não interfere na curva de dissociação da hemoglobina, os conceptos não devem ter sido submetidos à hipóxia, pois, quantidades iguais de oxigênio foram ofertadas aos dois grupos — A e B.

Embora Ingalls e col. (18), tenham chamado a atenção para a hipóxia e hipercapnia na gênese das malformações e, posteriormente, (19), relatado malformações relacionadas com hipóxia e anestesia, e Smith e col. (39) (1965 b), demonstrado que hipóxia e hipercapnia quando associados à anestesia potencializam a ação teratogênica dos anestésicos, não acreditamos que estes fatores tenham estado presentes durante nossa experimentação, nem influído em nossos resultados, não só pelos valores da medida da saturação, como pela analogia com os resultados de outros autores.

As malformações por nós encontradas, já descritas e referidas na figura 3, nas porcentagens de 21% para as crias de A e 0% para as crias de B, foram estatisticamente significantes ao nível considerado, nos permitindo admitir a anestesia pelo fluotano, como responsável por elas.

Esses mesmos tipos de malformações foram observados por Basford e col. (4), quando colocou ratas prenhes a uma atmosfera de fluotano com concentrações menores que a nossa, por um período de tempo mais prolongado, sem levar o animal ao sono anestésico, o que já havia sido por nós relatado (14).

A ação teratogênica de agentes anestésicos foi demonstrada pela primeira vez por Stockard em 1910. No entanto, só a partir de 1965 esses estudos foram reiniciados e pudemos observar que o tipo de malformações está mais relacionado com o animal utilizado na experimentação que com o tipo anestésico empregado.

Assim, ratas prenhes quando expostas a uma atmosfera de óxido nítrico (13,28,32), deram crias, que apresentaram os mesmos tipos de malformações (de costelas e coluna vertebral) que àquelas expostas ao fluotano.

No entanto, embriões de galinhas submetidos a ação do fluotano e pentrano (30,34), apresentaram malformações de crâneo e costelas. Esses mesmos tipos de malformações foram observadas quando o embrião de galinha foi exposta à atmosfera de óxido nítrico (26,27,33,35).

O estudo da mortalidade e do desenvolvimento através da curva ponderal, foi feito até o 15.º dia de vida e a análise estatística comparativa entre os grupos A e B, no 9.º e 12.º dias, porque, a partir do 13.º tanto a mortalidade como o desenvolvimento dos dois grupos — A e B, deixam de ser estatisticamente significantes.

Isto pode ser observado no gráfico 2, para estudo da mortalidade e 3 para a curva ponderal.

É importante notarmos, que as duas curvas se comportam igualmente, tanto para avaliação de mortalidade como

para a curva ponderal, em relação à idade dos animais. Elas são significativamente diferentes entre os grupos A e B até o dia 12.<sup>o</sup> de vida.

Como só estudamos as malformações que puderam ser constatadas a olho desarmado e documentadas fotograficamente, provavelmente outros defeitos teratogênicos, como os observados por Fink e col. (13), poderiam ter passado despercebidos, pois não realizamos necrópsias nos animais que morreram, podendo, pois serem estes, causa da maior mortalidade e menor desenvolvimento das crias de A em relação as de B, até o 12.<sup>o</sup> dia de vida. Basford e col. (4), em seus resultados, encontraram maior mortalidade de conceptos, em ratas que receberam anestesia pelo fluotano, e Shepard e col. (28), encontraram menor desenvolvimento de embriões de galinhas. Esses resultados, embora realizados em condições diferentes das nossas, são análogos.

O fato é que os animais do grupo A que conseguiram sobreviver após o 12.<sup>o</sup> dia, tiveram a mesma possibilidade de vida e o mesmo desenvolvimento ponderal que os do grupo B.

Para o estudo das alterações do índice mitótico e porcentual de metáfases do tubo neural e sómitos, anestesiámos o animal durante 3 horas, com o objetivo de abranger todo o período de uma divisão celular, cujo tempo médio é de 2 horas e 40 minutos, tendo a escolha recaído no 10.<sup>o</sup> dia de prenhez, por ser aquele em que a rata está mais susceptível à ação do agente anestésico (4).

A contagem feita por dois observadores, sendo que um deles estava alheio às nossas observações, teve por finalidade comparar os dois resultados, que foram semelhantes.

Como a recontagem realizada por um dos pesquisadores mostrou haver homogeneidade entre ambos, permitiu-nos realizar o estudo do índice mitótico e porcentagens de metáfases, sobre a soma dos núcleos contados pelos dois observadores.

De acordo com o que nós observamos e também Basford e col. (4), as malformações (cauda, coluna vertebral e costelas) são oriundas dos sómitos cujas causas consistem numa alteração de ritmo de crescimento dos embriões (37,38). Daí procurarmos estudar o índice mitótico e porcentagem de metáfases do sómitos da porção caudal do embrião, para a explicação das malformações por nós encontradas.

Como Snegireff e col. (35,38) encontraram alterações do índice mitótico e porcentagem de metáfases do tubo neural de embriões de galinhas, expostas ao fluotano, ciclopropano, e óxido nitroso, repetimos a mesma contagem no tubo neural do embrião da rata, para compararmos os resultados.

O nosso resultado mostrou um aumento do índice mitótico das células dos sómitos de A, em relação aos de B, por um aumento do número de metáfases, que foi estatisticamente significante, ao nível considerado, o mesmo não acontecendo em relação ao tubo neural, onde tivemos apenas um aumento significativo do índice mitótico, não havendo alterações em relação à porcentagem de metáfases.

Isto explica-se, pelo fato, de que as malformações por nós observadas, são de origem somíticas e não do tubo neural, como foi constatado por Snegireff e col. (35,36), quando estudaram o tubo neural de embriões de galinhas, onde as malformações (crâneos e costela) estão ligadas a esta parte do embrião.

Isso provavelmente se deve ao fato da ação do fluotano na rata se fazer sentir principalmente, ao nível dos sómitos e, no embrião de galinha, no tubo neural.

O mecanismo pelo qual os agentes anestésicos determinam a parada ou diminuição da mitose celular, observada por diversos autores (5,6,10,11,12,14,20,21,23,35,36), ainda não está bem esclarecido.

Dentre as várias hipóteses, a que nos parece mais viável para explicar as alterações por nós observadas, está aquela em que a ação do agente anestésico, determina um aumento do tempo das metáfases — Snegireff e col. (35,36), sendo um efeito semelhante da porcentagem de metáfases e do índice mitótico, pois, um maior número de células são encontradas em mitoses, pela parada da mitose em metáfases, o que, posteriormente daria uma diminuição do ritmo de crescimento do embrião, responsável pelas malformações.

Como estes fatos não estão ainda bem esclarecidos, havendo mesmo controvérsias entre pesquisadores, achamos, que estudos mais aprofundados devam ser realizados, com o emprego de radioisótopos e com a medida de cada tempo da divisão celular, para nos trazer melhores conhecimentos.

#### CONCLUSÕES

As crias das ratas que foram anestesiadas pelo halotano, apresentaram em relação ao grupo controle:

- 1 — Malformações de cauda, coluna vertebral e parede anterolateral do tórax;
- 2 — Maior índice de mortalidade;
- 3 — Menor índice de desenvolvimento;
- 4 — Maior índice mitótico das células dos sómitos com aumento significante da porcentagem de metáfases;

5 — Maior índice mitótico das células do tubo neural, sem aumento significativo da porcentagem da metafases.

SUMMARY

THE TERATOGENIC ACTION OF FLUOTHANE ON THE WHITE RAT

Forty one pairs of white rats were studied; half of these were submitted to a standardized halothane anesthesia while the other of the pair served as control. Anesthesia was given on the 6th, 8th, 10th, 12th and 14th day of gestation, which corresponds to different phases of cellular differentiation and the beginning of organ formation. During this period the rat seems to be more susceptible to teratogenic action. The following abnormalities were found in the new-born rats: malformations of the tail, vertebral column and anterolateral thoracic wall. There was an increase of the mitotic index of the cells in the somites and neural tube. There was also an increased mortality and lesser development of the babies of the rats subjected to Fluothane anesthesia.

REFERÊNCIAS

1. Andersen N B — The teratogenicity of cyclopropane in chicken. *Anesthesiology*, 29:113, 1968.
2. Andersen N B — The toxic and teratogenic effect of cyclopropane in chicken embryos. In: Fink B R, ed *Toxicity of anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1968 b, pp. 294-307.
3. Andersen N B — Anesthetics and cell division. *Anesthesiology*, 30:361-2, 1969.
4. Basford A B & Fink B R — The teratogenicity of halothane in the rat. *Anesthesiology*, 29:1167, 1968.
5. Bruce D L & Koepf J A — Changes in granulopoiesis in the rat associated with prolonged halothane anesthesia. *Anesthesiology*, 27:811, 1966.
6. Bruce D L & Traurig H H — The effect of halothane on the cell cycle in rat small intestine. *Anesthesiology*, 30:401, 1969.
7. Bruce D L, Koepf J A & Traurig H H — Studies of DNA synthesis in the halothane treated rat. In: Fink B R ed *Toxicity of anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 213, 1968.
8. Cahen R L — Evaluation of the teratogenicity of drugs. *Clin Pharmacol Ther* 5:480, 1964.
9. Child III C G & Douglas R G — Surgical problems arising during pregnancy. *Amer J Obstet Gynec* 47:213, 1944.
10. Eastwood D W, Green C D, Lambdin M A & Gardner R — Effect of nitrous oxide on the white-cell count in leukemia. *New Engl J Med* 268:297-9, 1963.
11. Fink B R & Kenny G E — Inhibition of cell culture growth by volatile anesthetics. *Fed Proc* 25:561, 1966.
12. Fink B R & Simpson III. W E — Cellular metabolic depression by volatile, barbiturate and local anesthetics. *Progress in anesthesiology: proceedings of the fourth World Congress of Anesthesiologists*. London, 1968. Amsterdam, Excerpta Medica, pp. 309, 1970.
13. Fink B R, Shepard T H & Blandau R J — Teratogenic activity of nitrous oxide. *Nature, (Lond)* 214:146, 1967.
14. Geretto J, Hayashi H & Marques de Castro N — Ação teratogênica de anestesia pelo 2-bromo-2-cloro-1-trifluoretano (fluothane) em ratas (*Ratus norvegicus albinus*) no período da prenhez. *Rev Paul Med* 69:313, 1966
15. Gregg N M — Congenital cataract following German measles in mother. *Trans Ophtal Soc Aust* 3:35, 1941.



16. Green C D & Eastwood D W — Effects of nitrous oxide inhalation on hemopoiesis in rats. *Anesthesiology*, 24:241, 1963.
17. Hamilton J B & Wolfe J M — The effect of male hormone substances upon birth and prenatal development in the rat. *Anat Rec* 70:433, 1938.
18. Ingalls T H & Curley F J — Principles governing the genesis of congenital malformations induced in mice by hypoxia. *New Engl J Med*. 257:1121, 1957.
19. Ingalls T H & Philbrook F R — Monstrosities induced by hypoxia. *New Engl J Med* 259:558, 1958.
20. Kieler J — The cytotoxic effect of nitrous oxide at different oxygen tensions. *Acta Pharmacol.* 13:301, 1957.
21. Lassen H C A, Henriksen E, Neukirch F & Kristensen H S — Treatment of tetanus: severe bone-marrow depression after prolonged nitrous oxide anaesthesia. *Lancet* 1:527, 1956.
22. Lenz W & Knapp K — Thalidomide embriopathy. *Arch environm Hlth*. 5:100, 1962.
23. Lillie R S — The action of various anaesthetics in supressing cell division in sea-urchin eggs. *J biol Chem* 17:121, 1914.
24. McIntosh R, Merrit K K, Richards M R, Samuels M H & Bellows M T — The incidence of congenital malformations a study of 5.964 pregnancies. *Pediatrics* 14:505, 1954.
25. Parbrook G D — Nitrous oxide toxicity. In: *Progress in anesthesiology: proceedings of the fourth World Congress of Anesthesiologists*. London, 1968. Amsterdam, Excerpta Medica, pp. 316, 1970.
26. Parbrook G D, Mobbs I & Mackenzie J — Effects of nitrous oxide on the early chick embryo. *Brit J Anaest* 37:990, 1965.
27. Rector G H M & Eastwood D W — The effects of an atmosphere of nitrous oxide oxygen on the incubating chick. *Anesthesiology* 25:109, 1964.
28. Shepard T H & Fink B R — Teratogenic activity of nitrous oxide in rats. In: Fink B R ed — *Toxicity of anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 308-21, 1968.
29. Sheridan C A & Robson J C — Fluothane in obstetrical anaesthesia. *Canad Anaesth Soc J* 6:365, 1959.
30. Smith B E — Teratogenicity of inhalation anaesthetics. In: *Progress in anesthesiology: proceedings of the fourth World Congress of Anesthesiologists*. London, 1968. Amsterdam, Excerpta Medica, pp. 319, 1970.
31. Smith B E, Gaub M L & Lehrer S B — Teratogenic effects of diethyl ether in the chick embryo. In: Fink B R ed — *Toxicity of anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins pp. 267-77, 1968.
32. Smith B E, Gaub M L & Moya F — Teratogenic effects of anesthetic agents: nitrous oxide. *Anesth Analg Curr Res* 44:726, 1965.
33. Smith B E, Gaub M L & Moya F — Teratogenicity of hypercarbia in combination with anesthetics in the chick embryo. *Fed Proc* 24:518, 1965 b.
34. Smith B E, Gaub M L & Moya F — Investigation into the teratogenic effects of anesthetic agents: the fluorinated agents. *Anesthesiology* 26:260-1, 1965 c.
35. Snegireff S L & Andersen N B — The effect of cyclopropane on mitosis in chicken embryos. *Anesthesiology*, 34:157, 1971.
36. Snegireff S L, Cox J R & Eastwood D W — The effect of nitrous oxide, cyclopropane o halothane on neural tube mitotic index, weight, mortality and gross anomaly rate in developing chick embryo. In: Fink B R ed — *Toxicity of Anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 279-93, 1968.
37. Stockard C R — The influence of alcohol and other anaesthetics on ebyronic development. *Amer J Anat* 10:369-92, 1910.
38. Wilson J G — Experimental studies on congenital malformations. *J chron Dis* 10:111, 1959.
39. Wilson J G — Introduction: problems of teratogenic testing. In: Fink B R, ed — *Toxicity of Anesthetics*. Baltimore Williams & Wilkins, pp. 259-68, 1968.