

EFEITO DO HALOTANO SOBRE O FÍGADO DE RATOS

II — Aspectos Histológicos

DRA. JOHANA LILIAN BROMBERG MARIN, E.A. (*)

DR. PAULO MELLO SOARES (**)

DR. AFONSO LUIS FERREIRA (***)

DR. MARCOS ANTONIO ROSSI (****)

Foram estudadas as repercussões histopatológicas sobre o fígado, em ratos submetidos à inalação repetitiva de concentrações sub-anestésicas de halotano, durante 2 horas por dia, por um período de 7 dias consecutivos. O grupo controle foi submetido nas mesmas condições, à inalação de oxigênio 100%.

O exame histológico realizado ao microscópio óptico mostrou uma nítida depleção do conteúdo de glicogênio, além de um discreto grau de degeneração turva dos hepatócitos. Em nenhum dos animais observou-se a ocorrência de necrose hepatocítica.

Os autores discutem a fisiopatologia dos achados tentando correlacioná-los com as reações de citotoxicidade provocadas por anestésicos inalatórios, eventualmente observadas na prática clínica.

Após sua introdução na Inglaterra (⁵⁰), o halotano tornou-se um dos anestésicos voláteis mais utilizados em todo o mundo, devido a suas excelentes propriedades físicas e químicas, que proporcionam grande potência anestésica, além de rapidez na indução e na recuperação. À medida que aumentava sua utilização na prática clínica, começavam a ser relatados na literatura casos de disfunção hepática (^{17,25,32,56,65}).

Recentemente, as possíveis repercussões tóxicas advindas da assim chamada "poluição" das salas cirúrgicas pelos

(*) Anestesiologista do Hospital das Clínicas da Fac. de Med. de Ribeirão Preto.

(**) Prof. assistente Doutor da Fac. de Med. de Ribeirão Preto — Depto. Cirurgia.

(***) Prof. Adjunto da Fac. de Med. de Ribeirão Preto — Dpto. Morfologia.

(****) Prof. Assistente Doutor da Fac. de Med. de Ribeirão Preto — Dpto. Patologia.

AP 1805

1496

anestésicos tem merecido especial atenção dos pesquisadores, e, em especial, a dos anesthesiologistas, obrigados que são a permanecer várias horas diariamente em contacto com os vapores anestésicos.

Numa tentativa de correlacionar este problema clínico com dados experimentais, em trabalho anterior (6) verificamos a ocorrência do fenômeno da indução enzimática microsomal no fígado de ratos submetidos à inalação repetitiva de concentrações sub-anestésicas de halotano. Agora, no presente estudo procuramos verificar se, além da alteração funcional responsável pelo aumento no metabolismo de drogas, existe também uma alteração na arquitetura histológica do hepatócito em animais submetidos à inalação repetitiva de halotano.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 10 ratos machos da raça Sprague Dawley os quais eram colocados numa câmara especialmente construída para anestesia de pequenos animais (6). O analgésico utilizado foi o halotano, vaporizado através de um vaporizador calibrado de Takaoka, modelo Fluovapor 1200, em uma concentração de 0,25%, com um fluxo de oxigênio de 5 l/min, cuja concentração era controlada através de um aparelho Fluotest modelo 90 de Takaoka. Para evitar-se uma eventual reinalação de gás carbônico (CO₂) no interior da câmara, colocou-se cal sodada em grânulos em uma quantidade que seguramente excedia de várias vezes à necessária para absorção de CO₂ na câmara. O tempo de exposição dos ratos ao anestésico foi de 2 horas por dia, durante 7 dias consecutivos.

O grupo controle foi constituído de 10 ratos machos submetidos à inalação diária de oxigênio a 100% com um fluxo de 5 l/min, por 2 horas durante 7 dias consecutivos.

Manteve-se sempre, para ambos os grupos de animais, um intervalo de 24 horas entre as exposições, durante as quais os animais eram mantidos em caixas de madeira, com água e alimentação "ad libitum", com as precauções usuais no sentido de se evitar contacto com substâncias possivelmente hepatotóxicas, especialmente inseticidas. A temperatura e ventilação do ambiente em que permaneceram durante todo o período experimental foram consideradas satisfatórias, com uma iluminação de aproximadamente 10 horas diárias.

Estudo Histológico: — Na manhã do 8.º dia (24 horas após a última exposição) os ratos eram sacrificados por decapitação, exsanguinados e de seus fígados eram separados 2 fragmentos para cortes histológicos em duplicata. O fixador utili-

zado foi o Gendre gelado, conservado a aproximadamente 40°C (33).

A fixação do material era feita durante 3 horas, em geladeira. A seguir lavava-se o material em banhos de álcool 90° para retirar o excesso de ácido pícrico.

O material assim fixado, a seguir era incluído em parafina e cortes em duplicatas foram corados com PAS (ácido periódico de Schiff) e HE (Hematoxilina e eosina) e examinado em microscópio óptico.

RESULTADOS

As alterações histopatológicas mais evidentes conforme ilustram as fotomicrografias anexas (Figura 1, 2, 3 e 4) referem-se à uma depleção nítida de glicogênio dos hepatócitos nos animais submetidos à inalação repetitiva do halotano quando comparados aos controles. Além da depleção de glicogênio podemos notar um discreto grau de degeneração turva dos hepatócitos dos animais tratados.

Não observamos, em nenhum dos casos estudados (10 tratados e 10 controles) a ocorrência de necrose hepatocítica.

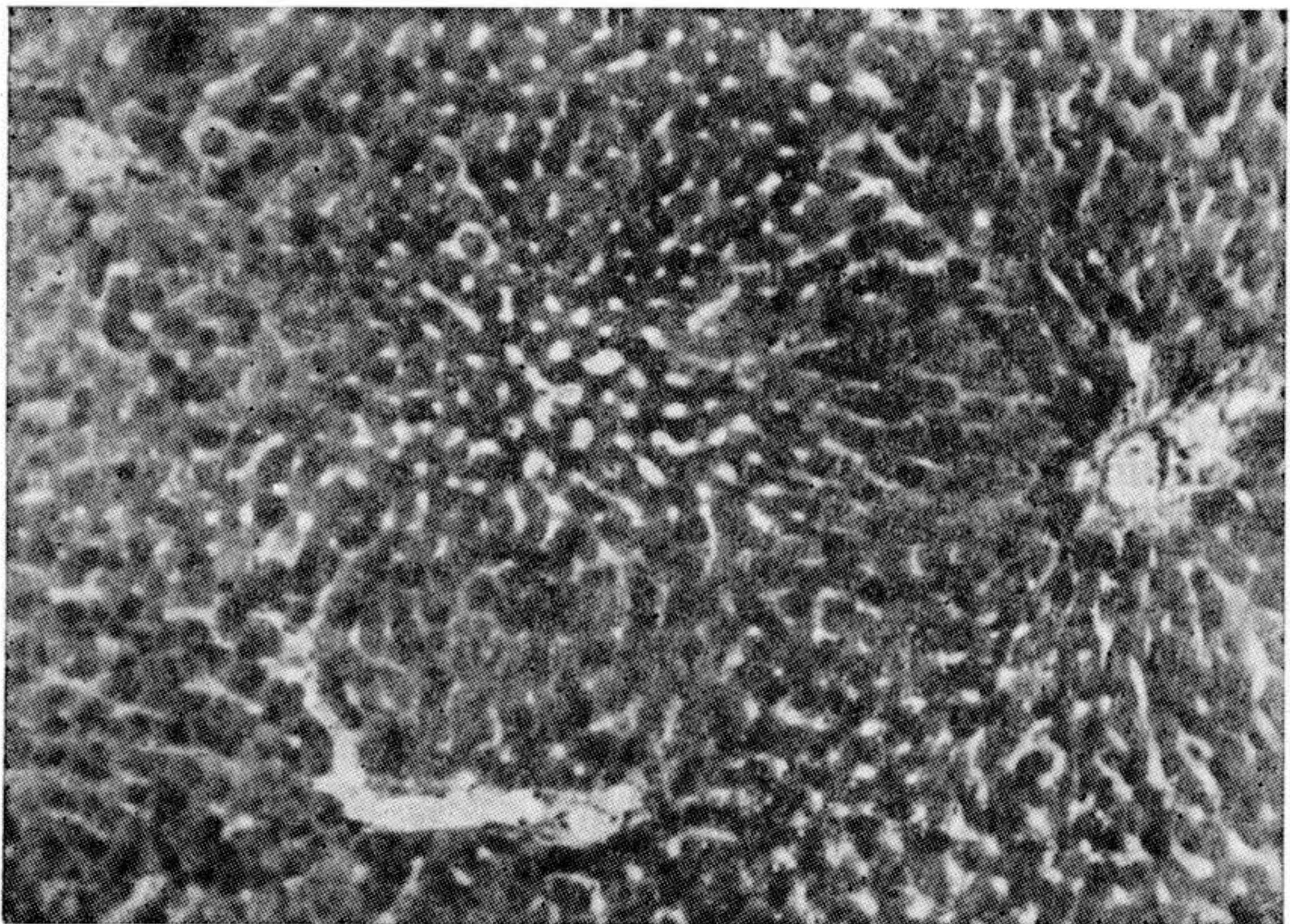


FIGURA 1

Rato controle. Fígado. Fixação: Gendre gelado. Coloração: PAS-hematoxilina. Aumento: 160x.

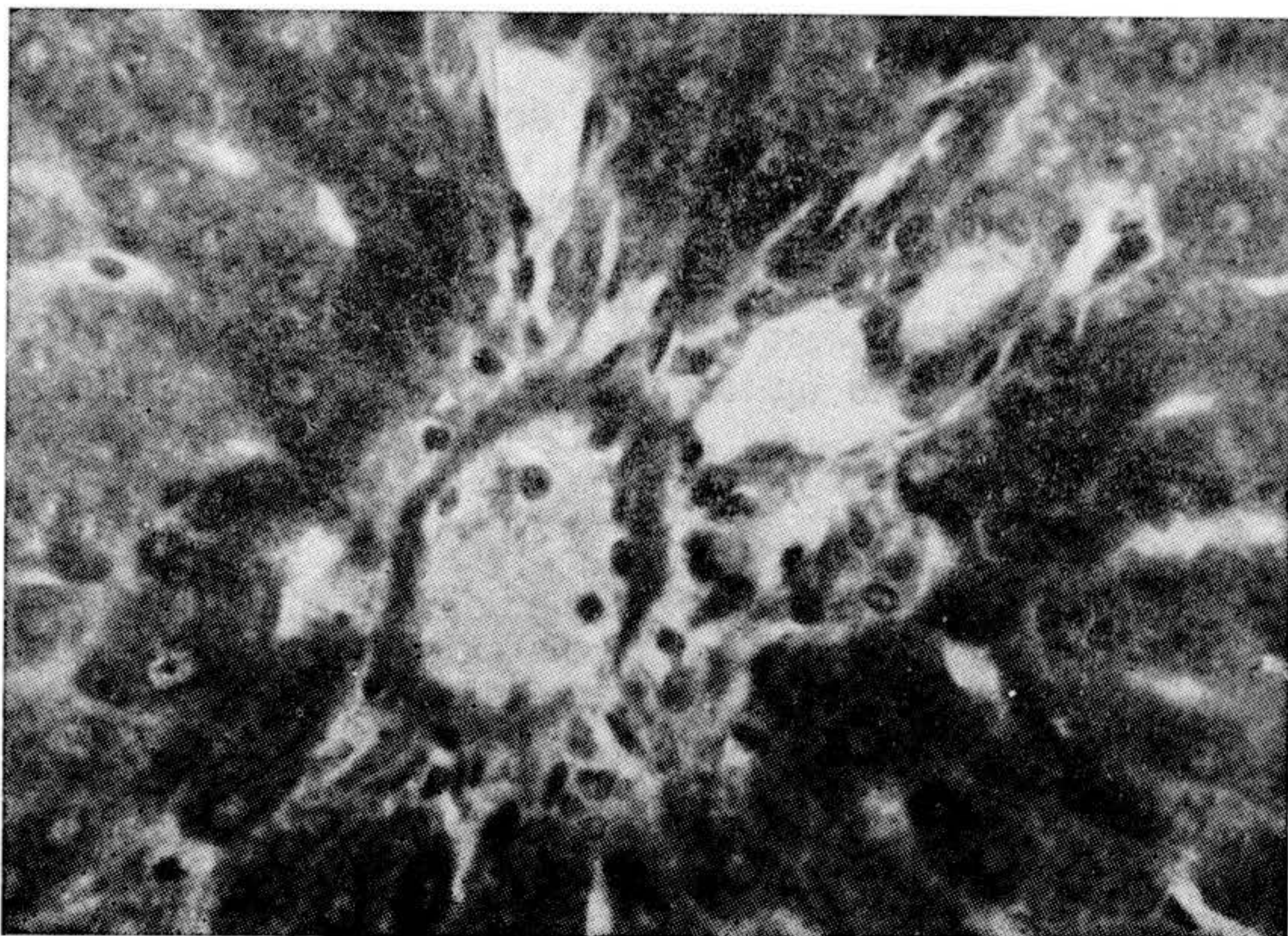


FIGURA 2

Rato tratado pelo halotano (7 dias). Fígado. Diminuição de glicogênio dos hepatócitos. Fixação: Gendre gelado. Coloração: PAS-hematoxilina. Aumento: 160x.

Todos os animais sobreviveram durante o período experimental, tendo suas mortes ocorrido por decapitação, na manhã do 8.º dia.

DISCUSSÃO

A maioria dos autores concorda que o halotano possa determinar alterações patológicas incluindo necrose hepática, especialmente após múltiplas exposições (5,7,32,16,3,28,29,11,26,20,58,39,9,35).

Durante a seqüência experimental deste estudo, dois aspectos foram particularmente controlados no sentido de evitar-se que intercorrências indesejáveis pudessem prejudicar a consecução dos objetivos propostos: um deles se refere à via de administração e o outro à concentração da mistura inalatória empregada.

Quanto à administração, foi utilizada a via inalatória, pois é a normalmente empregada na prática clínica e o modelo experimental pretendido visava assemelhar-se o mais possível às condições clínicas usuais. Foust (22) ressalta bem a importância da via de administração das drogas sobre o estado da atividade enzimática microsomal. Quando a via

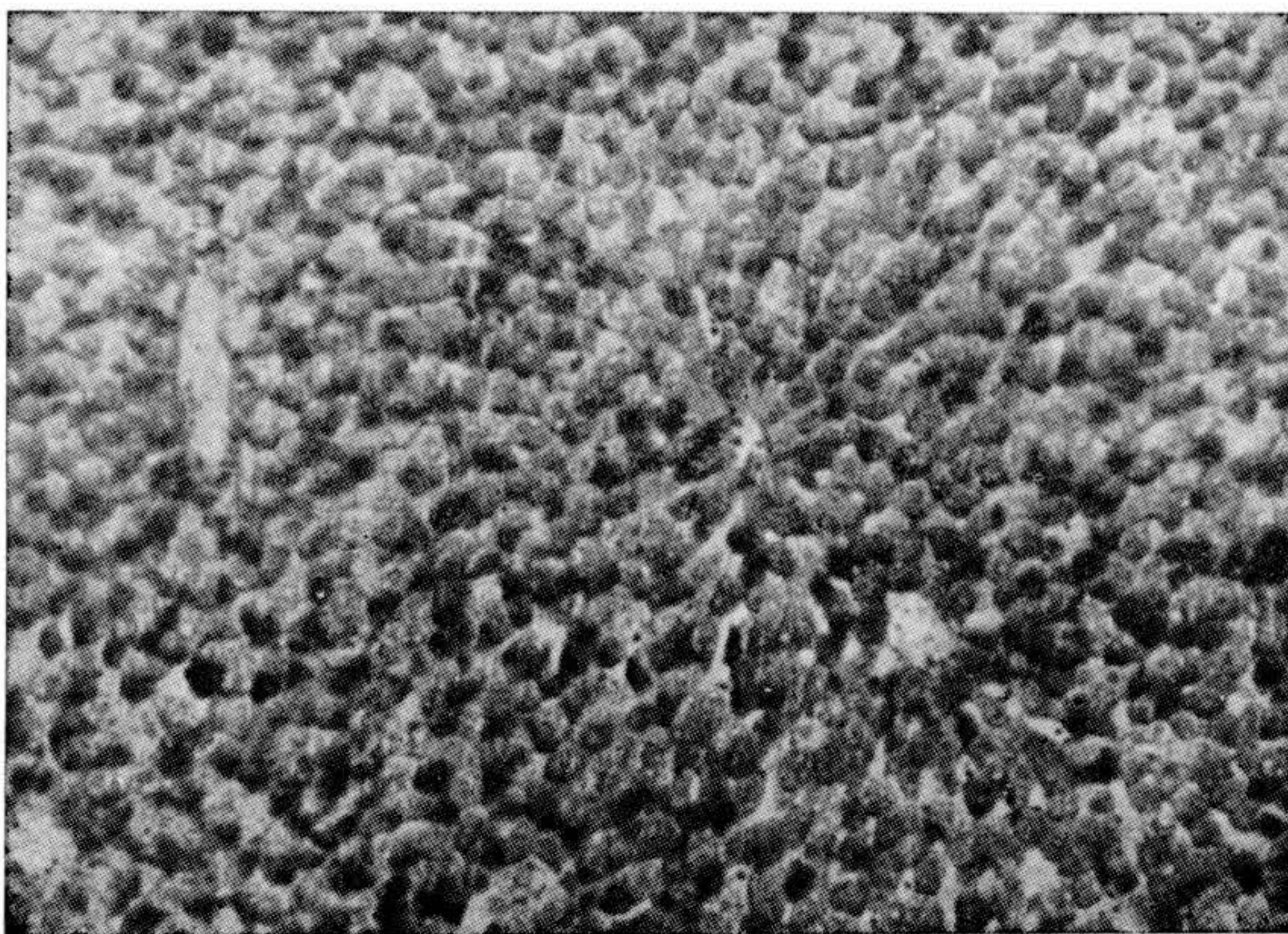


FIGURA 3

Rato Controle. Fígado — veia centro-lobular. Fixação: Gendre gelado. Coloração: PAS-hematoxilina. Aumento: 560x.

intra-peritoneal é a escolhida, deve-se ter em mente que o composto está sendo oferecido quase que diretamente ao fígado, sem praticamente ser submetidos às influências decorrentes de emprego de outras vias, em especial a inalatória⁽¹²⁾. Severas críticas são feitas neste sentido, às conclusões advindas dos trabalhos independentes de Davis e col⁽¹⁵⁾ e Stenger e Johnson⁽⁶⁰⁾, os quais administraram halotano por via intra-peritoneal em ratos previamente induzidos com fenobarbital, verificando necrose multifocal no parênquima hepático, além de uma diminuição na capacidade metabólica do órgão. Estes efeitos podem ser atribuídos ao excesso de concentração da droga que, atingindo o hepatócito diretamente, aí exerce seus efeitos tóxicos. O emprego da via oral⁽²⁷⁾ é passível também de restrições, assim como os estudos realizados empregando-se a perfusão de fígado com o anestésico^(4,62).

Em relação à mistura inalatória de oxigênio e halotano, esta foi empregada em concentrações consideradas sub-anes-tésicas, o que permitia aos ratos tratados permanecerem no interior da câmara em um estado de quietude e tranqüilidade, sem hipnose, não apresentando depressão respiratória e reagindo quando um estímulo doloroso era aplicado por meio de pinçamento da cauda. Além disso, imediatamente após

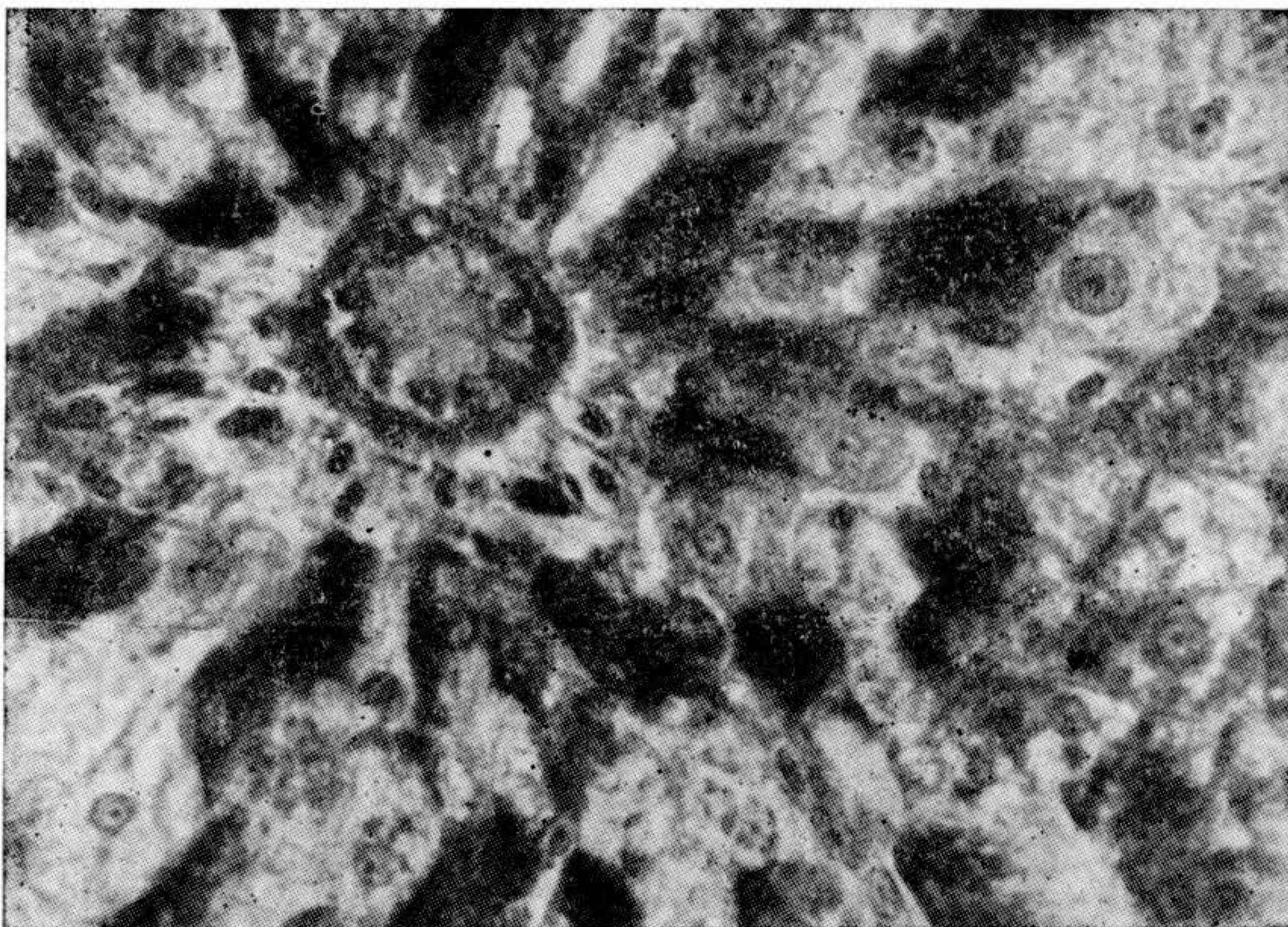


FIGURA 4

Rato tratado pelo halotano (7 dias). Fígado — veia centro-lobular. Mostra nítida diminuição de glicogênio dos hepatócitos, comparada com a figura anterior. Fixação: Gendre gelado. Coloração PAS-hematoxilina. Aumento: 560x.

terminado o período de exposição ao anestésico, ao serem retirados da câmara, readquiriam movimentação e reflexos habituais, sem aparente efeito residual da droga, inclusive alimentando-se normalmente. O cuidado na observação destes parâmetros foi o mais rigoroso possível no sentido de evitar-se a ocorrência de hipóxia, hipercapnia, depressão circulatória ou nutrição insuficiente, fatores estes que podem alterar os sistemas envolvidos no metabolismo de drogas, conforme salientam Morris e col. (44) e outros (23,34,42). Em relação a esses fatores, o trabalho de Stevens et al (61) é passível de críticas. Nesse trabalho, ratos foram submetidos à concentração sub-anestésicas de halotano por um período de 35 dias e as alterações histopatológicas degenerativas verificadas no fígado, assim como a redução no ganho ponderal observado nos animais, bem que poderiam ser imputadas à deficiência de alimentação, determinada pela administração ininterrupta do agente anestésico.

No que se refere à repercussões estruturais da administração repetitiva do halotano, as observações ao microscópio óptico, realizadas neste trabalho, mostraram principalmente uma nítida depleção no conteúdo hepatocítico de glicogênio. Estes resultados são concordantes com os de Almersjo (1) que

encontrou, ao microscópio óptico, uma diminuição do glicogênio hepático em ratos previamente tratados com fenobarbital e anestesiados com halotano durante 150 minutos. Remmer (51) em estudos realizados com microscópio eletrônico constatou diminuição do glicogênio hepático e concomitantemente proliferação do retículo endoplasmático liso do hepatócitos em ratos induzidos com fenobarbital. Turchini e col. (63) observaram diminuição de glicogênio e de ácido ribonucleico em ratos após inalação repetitiva de metoxifluorano. A depleção de glicogênio hepático observada em nosso trabalho talvez possa estar associada ao aumento de glicemia que ocorre durante a anestesia com diversos agentes anestésicos, inclusive o halotano (65,42,66), provavelmente devido a uma glicogenólise aumentada (30). Observa-se também uma elevação acentuada dos níveis cerebrais de glicose, glicose-6-fosfato e glicogênio (8,38) durante a anestesia com halotano. Outra possível explicação para a diminuição do glicogênio hepático seria que a ocorrência de indução enzimática microsomal determinasse velocidade metabólica aumentada com maior consumo de energia, proveniente das reservas de glicogênio. Neste sentido, o glicogênio é uma fonte de energia metabólica, cujo produto de degradação, através da glicogenólise; é a glicose-1-fosfato que é convertida em glicose-6-fosfato (87). Conforme salienta Mannering (36), a metabolização de substâncias exógenas pelo sistema microsomal enzimático, depende de um sistema gerador de nicotinamida-adenina-difosfonucleotídeo reduzido (NADPH), consistindo de nicotinamida-adenina-desidrogenase, ou do próprio NADPH. As presenças do íon magnésio de oxigênio molecular são também fundamentais, conforme comprovação experimental de Posner e col. (49). Estes trabalhos basearam-se nas descrições de Mueller e Miller (45,46) de que o metabolismo de compostos exógenos ocorreria, nos microssomas hepáticos, às custas da NADP, NAD e oxigênio molecular.

O conteúdo de glicogênio do hepatócito tem sido considerado como um índice de trauma agudo desde os trabalhos de Rosenbaum (54). Revendo a literatura, observamos uma discordância entre os autores no que se refere ao quadro histopatológico encontrado nas hepatites virais, contraposto ao verificado nas hepatites produzidas pelo halotano, em relação ao conteúdo de glicogênio. Segundo observações independentes de Ruegner e col. (55), na hepatite viral o glicogênio diminui acentuadamente; já Usunalimoglu e col. (64) afirmam que na hepatite pós halotano as concentrações de glicogênio estariam até mesmo aumentadas.

Além da depleção do glicogênio hepático, observamos também um aspecto histológico de tendência à degeneração turva dos hepatócitos dos animais tratados com halotano.

Robbins (62) atribui esta alteração, que se manifesta pelo aspecto granuloso e tumefeito das células, basicamente a um acúmulo anormal intracelular de água, com possível modificação do estado físico-químico do gel-proteínico ou de organelas de citoplasma. Vários autores comprovaram que anestésicos voláteis, incluindo o halotano, inibem a respiração mitocondrial, bloqueando enzimas oxidantes do ciclo de Krebs. Este efeito resultaria em deficiente liberação de energia necessária para o transporte de água para o exterior da célula, resultando na assim chamada degeneração turva (10,13,24) Robbins atribui à degeneração turva um aspecto benigno e reversível, frisando, porém, que pode evoluir para degeneração hidrópica ou vacuolar, processo mais grave o que eventualmente precede à morte celular. Os animais do presente trabalho apresentaram, conforme referido, uma tendência à degeneração turva após o período de 7 dias de exposição ao halotano. Não é importável que as lesões pudessem se acentuar se a exposição tivesse sido mais prolongada.

Outrossim, não encontramos, em nenhum dos animais tratados, a ocorrência de lesões descritas por outros autores, como necrose centrolobular, esteatose hepatocítica, ou reações do tipo inflamatório (2,3,5,7,21,29,31,32,57,60,64,65). A não constatação dessas alterações é compatível com a possibilidade de que outros fatores intervenham para modificar a reação do fígado ao halotano, provocando resultados inconstantes e heterogêneos. Fatores relacionados com aspectos imunológicos sugeridos por diversos pesquisadores (14,19,48,53,58) ofereciam condições propícias para a ocorrência variável de alterações histopatológicas. Reação imunológica cutânea foi produzida experimentalmente por Mathieu e col. (37) por meio de injeções intra-dérmicas de trifluoracetato, um metabolito do halotano. Esta verificação veio confirmar as hipóteses de Remmer (51), de que os produtos de degradação do anestésico poderiam funcionar como haptenos, os quais reagindo com proteínas, formariam compostos capazes de provocar respostas imuno-celulares específicas em indivíduos ou animais "sensíveis". A observação da raridade de ocorrência de lesões hepáticas na prática anestesiológica, em que o halotano ocupa um lugar de destaque devido às suas excelentes qualidades clínicas, parece coadunar-se com esta hipótese. No mesmo sentido, temos os relatos de Solosko e col. (59) sobre suas observações em um paciente que recebeu 111 anestésias com o agente referido, em um período de dez anos, sem que apresentasse durante todo o período de seguimento, sinais clínicos ou laboratoriais de comprometimento hepático. Ainda sugerindo a interação destes fatores, possivelmente imunológicos, são descritas a

ocorrência de artralguas, manifestações alérgicas e de hipersensibilidade em indivíduos que apresentam icterícia e eosinofilia no período pós anestésico (29). Acreditamos que a comprovação dessas hipóteses requeira, entretanto, investigações mais minuciosas e dirigidas para a exploração de tais fenômenos, transcendendo os objetivos deste trabalho.

SUMMARY

THE EFFECTS OF HALOTHANE ON THE RAT LIVER

II — HISTOLOGICAL STUDY

A series of 10 rats were subjected to the inhalation of repetitive sub-anesthetic doses of halothane, for periods of two hours on 7 consecutive days, while another series inhaled 100% oxygen serving as controls. A comparative histologic study of their livers showed a visible reduction in the amount of stored glycogen besides a slight degree of cloudy swelling of the liver cells. No animal showed liver necrosis.

The physiopathology of these findings are discussed, while a correlation with possible mechanisms of cytotoxicity of inhalation anesthetics observed in clinical practice is suspected.

REFERÊNCIAS

1. Almersjo O — Influence of halothane anesthesia on the rat liver with stimulated drug metabolism. *Acta Chir Scand Suppl*, 4, 16:57, 1971.
2. Belfrage S, Ahlgren I, and Axelson S — Halothane hepatitis in an anesthetist. *Lancet*, II: 1466, 1966.
3. Blackburn W R, Ngai S H and Lindenbaum J — Morphologic changes in hepatic necrosis following halothane anesthesia in man. *Anesthesiology*, 25:270, 1964.
4. Bombeck C T, Aok T, Smuckler E a and Nyhus L M — Effects of halothane, ether, and chloroform on the isolated, perfused, bovine liver. A comparative study. *Amer J Surg*, 117:91, 1969.
5. Brody G L and Sweet R B — Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis. *Anesthesiology*, 24:29, 1963.
6. Bromberg Marin J L, Soares P M, Rotschild A M — Efeito do Halotano sobre o fígado de ratos. I. Indução enzimática microsomal. *Rev Bras Anest* 27, 1977.
7. Brunker J P and Blumenfeld C M — Liver necrosis after halothane anesthesia: cause or coincidence? *New Eng J Med* 268:531, 1963.
8. Brunner E A, Passonneau J U and Molstad C — The effect of volatile anesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. *J. Neurochem*, 18:2301, 1972.
9. Chenoweth M B, Leong B K J, Sparschu G L and Tor Kelson T R — Toxicities of methoxyflurane, Halothane and Diethyl Ether in laboratory animals on repeated inhalation at subanesthetic concentrations. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*. Ed B R Fink, William & Wilkins Co. Baltimore, pp 275, 1972.
10. Christie G S and Judah J D — Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells. *Proc Royal Soc Brit*, 142:241, 1954.
11. Christensen S, Askrog V F, Olsen T S, Kempered E and Tygstrup N — Liver function, histology, and cytochemistry in man following halothane and cyclopropane anaesthesia. *Acta Hed Scand*, 180:29, 1966.

12. Cohen B N, Belville J W and Brown B W — Anesthesia, pregnancy, and miscarriage: A study of operating room nurses and anesthesiologists. *Anesthesiology*, 45:343, 1971.
13. Cohen E N and Trudell J R — Nonvolatile metabolites of halothane. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*, Ed B R Fink, Williams K Wilkins Co, Baltimore, pp 250, 1972.
14. Davies G E and Holmes J E — Drug induced immunological effects on the liver. *Brit J Anaesth*, 42:941, 1972.
15. Davis D C, Shoroeder D H, Gram T E, Reagan R L and Gillette J R — A comparison of the effects of halothane and CCl₄ on the hepatic drug metabolizing system. *J Pharmacol Exp Ther*, 177:556, 1971.
16. Defalque R J and Stoelting V K — Hepatic failure after halothane. *Anesthesiology*, 25:868, 1964.
17. Dodson M E — The proof of guilt. A study of case reports of postoperative jaundice. *Brit J Anaesth*, 44:207, 1972.
18. Dodson M E and Richards T G — A prospective study of changes in liver function after operation under two forms of general anaesthesia. *Brit J Anaesth*, 44:47, 1972.
19. Domach D — Cell mediated immunity in halothane hypersensitivity. *N Eng J Med* 283:315, 1970.
20. Dykes M H M, Gilbert J P and Mac Peck B — Halothane in the United States. *Brit J Anaesth*, 44:295, 1972.
21. Fleming S A and Bearcroft W G C — The effect of repeated administration of halothane on the livers of healthy monkeys. *Canad Anaesth Sc J* 13:247, 1966.
22. Fouts J R, Liver — Smooth Endoplasmic Reticulum Microsomal Drug. Metabolizing Enzyme System. In: *Methods in Pharmacology*, Vol. I, Ed A Schwartz, New York, Appleton. Century Crofts, pp 287, 1969.
23. Galindo A — Hepatic circulation and hepatic function during anesthesia and surgery. *Canad Anaesth Soc J* 12:262, 1965.
24. Hall G M, Kirtland S J and Baum H — The inhibition of mitochondrial respiration by inhalation anesthetic agents. *Brit J Anaesth* 45:1005, 1973.
25. Harrison G G, and Smith J S — Massive lethal hepatic necrosis in rats anesthetized with fluorexene after microsomal enzyme induction. *Anesthesiology*, 39:619, 1973.
26. Hughes H C and Lang M — Hepatic necrosis produced by repeated administration of halothane to guinea pigs. *Anesthesiology*, 36:466, 1972.
27. Jones W M, Margolis G and Stephen C R — Hepatotoxicity of inhalation anesthetic drugs. *Anesthesiology* 19:715, 1958.
28. Klatskin G — Symposium on toxic hepatitis. *Gastroenterology*, 38:789, 1960.
29. Klatskin G and Kimberg D V — Recurrent hepatitis attributable to halothane sensitization in an anesthetist. *N Eng J Med* 280:515, 1968.
30. Keating V J, Patrick S J and Anhamunthodo H — Halothane and carbohydrate metabolism. *Anaesthesia*, 14:268, 1959.
31. Klion F M, Schaffner F and Popper H — Hepatitis after exposure to halothane. *Ann Int Med* 71:467, 1969.
32. Lindenbaum J and Leifer E — Hepatic necrosis associated with halothane anesthesia. *New Eng J Med* 268:525, 1963.
33. Lison L — Polysaccharides non azotés. A Glicogène. In *Histochemie et cytochimie animals*. 2eme éd., Paris, Ed Gauthier Villar, 1953.
34. Little D M and Wetstone H J — Anesthesia and the liver. *Anesthesiology*, 25:815, 1964.
35. Löfstrom J B (Ed) — Biochemical effects of halothane. *Acta Anaesth Scand Suppl.* 49:40, 1972.
36. Mannering G J — Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. In *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, B N. La Du H G Mandel, E L Wa Eds The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1971.

37. Mathieu A, Di Padua D, Mills J and Kahan B — Experimental immunity to a metabolite of halothane and fluorexene: cutaneous delayed-type hypersensitivity. *Anesthesiology*, 40:385, 1974.
38. Mayman C I, Gatfield P D and Breckenridge B M — The glucose content of brain in anesthesia. *J Neurochem*, 11:483, 1964.
39. Mc Caughey — A Summary of the National Halothane Study. *Brit J Anaesth* 44:918, 1972.
40. Medrado V C e Ribeiro L A — Efeitos da anestesia pelo fluotano sobre fígado de cães. *Rev Bra Anest* 14:16, 1964.
41. Miller R N and Hunter F E — The effects of halothane on electron transport, oxidative phosphorylation, and swelling in rat liver mitochondria. *Molec Pharmacol*, 6:67, 1970.
42. Morris L E and Feldman S A — Influence of hypercarbia and hypotension upon liver damage following halothane anesthesia. *Anaesthesia*, 18:32, 1963.
43. Mueller G C, and Miller J A — The reductive or e-dimetrylaminoazobenzene by rat liver the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement of triphosphopyridine nucleotide.
44. Mueller G C and Miller J A — The metabolism of methylatedaminoazo dys. II Oxidative demethylation by rat liver homogenates.
45. Nicoletti R L, Soares P M, Costa Pereira M S, Mele R R e Biaggioni A C — — Variações da glicemia durante a anestesia em pacientes não diabéticos. *Rev Bras Anest* 15:217, 1965.
46. Paronetto F and Popper H — Lymphocyte stimulation induced by halothane in patients with hepatitis following exposure to halothane. *New Eng J Med* 283:277, 1970.
47. Posner H S, Mitoma C, Rothberg S, and Udenfriend S — Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Arch Biochem Biophys*, 94:280, 1961.
48. Raventos J — The action of fluothane. A new volatile anaesthetic. *Brit J Pharmacol*, 11:394, 1956.
49. Remmer H — Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver. *Europ J Clin Pharmacol*, 5:116, 1972.
50. Robbins S L (Ed.) — *Patologia*. Livraria Ed. Guanabara Koogan, S/A, 2.ª ed, pp 114, 1965.
51. Rodriguez M, Paronetto F and Schaffner F — Antimitochondrial antibodies in jaundice following drug administration. *J A M A*, 208:515, 1969.
52. Rosenbaum F — Kohlehydratbestand nach acuten intoxicationen. *Archiv Pharm Exp Path* 15:450, 1882. Apud Almeresjö O E in *Acta Chir Scand Suppl*, 416:57, 1971.
53. Ruebner B H and Slusser R J — Hepatocytes and sinusoidal lining cells in viral hepatitis: an electron microscopic study. *Arch Path*, 86:1, 1968.
54. Sadove M S and Kim S I — Hepatitis after use of different fluorinated anesthetic agents. *Anaesth Analg C R*, 53:336, 1974.
55. Schoeller K L — Electron microscopic and autoradiographic studies on the effect of halothane and chloroform on liver cells. *Acta Anaesth Scand Suppl*, 32, 1968.
56. Smuckler E A — The pathology of halogenated hydrocarbons and halothane: a brief review and speculation. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*, Ed B R Fink. The Williams & Wilkins Co Baltimore, pp 221, 1972.
57. Solosko D, Frissell M and Brian Smith R — 111 Halothane, anesthetics in pediatric patient: Case Report *Anesth Analg C R* 51:706, 1972.
58. Stenger R J and Johnson E A — Effects of phenobarbital pretreatment on response of rat liver to halothane administration. *Proc Soc Exper Biol Med* 140:1319, 1972.
59. Stevens W C, Eger E I, White A, Halsey M J, Munger W, Gibbons R D, Dolan W and Shargel R — Comparative toxicities of halothane, isoflurane and diethyl ether at subanesthetic concentrations in laboratory animals. *Anesthesiology*, 42:388, 1968.

60. Strunin L, Waver E J M, Smith J M and Simpson B R — A comparison of the effects of chloroform and halothane on an isolated canine liver perfusion preparation. *Brit J Anaesth*, 38:412, 1966.
61. Turchini J, Du Cailar, Catayée G and Laurés M — Action d'un anestésique volatil, le methoxyflurane, sur quelques organes de Rongeurs. Etude expérimentale de l'intoxication chronique. *C R Soc Biol (Paris)*, 159:1814, 1965.
62. Uzunalimogiu B, Yardley J H and Boitnott J K — The liver in mild halothane hepatitis. *Amer J Pathol*, 61:457, 1970.
63. Virtue R M, Payne K W, Caranna L J, Gordon G S and Rember R R — Observations during experimental and clinical use of fluothane. *Anesthesiology*, 19:478, 1958.
64. Watson B G — Blood glucose levels in children during surgery. *Brit J Anaesth*, 44:712, 1972.
65. White A, Handler P and Smith E L — Physiological role of glycogen. In *Principles of Biochemistry*. Ed Mac Graw-Hill Book Company New York, Toronto, London, 3rd Ed, pp 417, 1964.
66. Wilbert L and Creutzfeldt W — Recurrent jaundice and fatal liver necrosis following a second administration of halothane. *German M Monthly* 12:360, 1967.
67. Willis E J — Acute infective hepatitis. Fine structural and cytochemical alterations in human liver. *Arch Path*, 86:184, 1968.