

1593

AÇÃO DO HALOTANO SOBRE O ASPECTO HISTOLÓGICO DO FÍGADO E RINS E SOBRE A MORTALIDADE DE CRIAS DE RATAS SUBMETIDAS A ESSE AGENTE ANESTÉSICO NO FIM DA GRAVIDEZ (*)

DR. HERMANCE PONCE DE CARVALHO ROCHA, E.A. (**)

Utilizamos como material de estudo 50 ratas prenhes (*Rattus norvegicus albinus*), as quais dividimos em três Grupos: Grupo A com 20 ratas; Grupo B, com 20 ratas e Grupo C, com 10 ratas.

Elegemos o 19.º dia de gravidez como a data do experimento, a fim de atender ao que nos propusemos, considerando que o tempo de gestação das ratas dura de 20 a 21 dias.

Padronizamos uma concentração anestésica de halotano (1%) associada a um fluxo de oxigênio de 6 lts/minuto, com o que submetemos as ratas do Grupo A durante 60 minutos.

As ratas do Grupo B, foram submetidas durante o mesmo tempo a um idêntico fluxo de oxigênio.

As ratas do Grupo C tiveram uma evolução normal de suas gestações, sem que no 19.º dia a nada fosse submetidas.

Acompanhamos os nascimentos das crias dos três grupos, sendo observada a maior incidência de crias mortas nascidas de ratas que receberam halotano a 1% e oxigênio (Grupo A).

Separadas as crias mortas, foi sacrificada todos os dias uma cria de cada grupo e retirados fígado e rins para estudo histopatológico.

Notou-se, no final, dos estudos histopatológicos a evidência de lesão hepática tipo vacuolização citoplasmática e lesões renais tipo degeneração grânulo-hialina e degeneração vacuolar. Essas lesões mostraram-se mais frequentes nas crias das ratas submetidas ao halotano (Grupo A), não havendo diferença significativa entre este grupo e o das ratas mantidas em ar (Grupo C).

Foi verificado que as lesões das crias das ratas submetidas ao oxigênio (Grupo B), durante o mesmo tempo e nas mesmas condições daquelas submetidas ao halotano (Grupo A), foram menos frequentes que as dos outros grupos.

O estudo da mortalidade e das lesões hepáticas e renais verificadas nas crias de ratas submetidas ao halotano a 1% (Grupo A), a oxigênio puro (Grupo B) nas mesmas condições, ou mantidas em ar (Grupo C) leva à conclusão de efeito tóxico desse agente anestésico.

(*) Parte da Tese apresentada como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina, à Comissão Julgadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

(**) Prof. Assist. Doutor Regente da Disciplina de Anestesiologia do Centro de Ciências Biológicas e Médicas de Sorocaba — PUC — SP.

AP 2012

O objetivo da anestesia para obstetrícia, é o de promover condições ótimas para o trabalho do obstetra em todas as formas de intervenção sem contudo, pôr em risco a vida materna e fetal; por outro lado, quando qualquer uma das duas vidas está em perigo, é importante que o anestesiolegista empregue uma técnica adequada, a fim de remover os perigos ou, pelo menos, não adicionar mais alguns riscos além dos já existentes.

Tais perigos existem não somente durante o trabalho de parto, mas também no decorrer da gravidez, constituindo um problema complexo, relacionado a vários fatores:

1. Presença de dois organismos que podem ser lesados, o materno e o fetal.
2. Alterações fisiológicas e patológicas dos organismos materno e fetal durante a gravidez.
3. Interferência de drogas e técnicas anestésicas sobre a dinâmica uterina, mais o sangramento operatório e o desenvolvimento fetal.
4. Passagem de agentes anestésicos e outras drogas através da placenta.

A passagem de drogas através da placenta constitui um aspecto importante da anestesia durante a gravidez, uma vez que poderá interferir de maneira desfavorável sobre o embrião e o feto, distribuindo-se pelos seus tecidos e determinando uma série de efeitos deletérios, como sejam:

a - efeitos depressores; depressão cerebral e nervosa⁽¹⁴⁾; depressão das funções hepáticas e renais, da função cardíaca, respiratória, etc. Essas depressões são mais importantes quando a anestesia é administrada durante o trabalho de parto pois poderão refletir-se nas condições do concepto imediatamente após o nascimento.

b - Alterações no desenvolvimento e maturação de tecidos e sistemas do organismo fetal. Numerosos estudos tem sido realizado, a respeito das propriedades teratogênicas dos anestésicos^(3,13,15,16,46).

c - Ação sobre órgãos e tecidos já desenvolvidos. Poucos trabalhos tem sido realizados no sentido de estudar a ação dos anestésicos administrados durante a gestação sobre tecidos e órgãos fetais já completamente desenvolvidos.

Na anestesia experimental encontram-se as observações feitas por Stephen et al.^(48,49), Jones et al.⁽²³⁾, Gibson⁽¹⁷⁾, os quais observaram com resultados obtidos em estudos ex-

perimentais em ratos cães e macacos, que a anestesia pelo halotano produz alterações na morfologia hepática, sem destruição celular, mas com formação vacuolar por infiltração gordurosa.

Trevino Garcia Manzo et al. (32) em estudo experimental histológico, com microscopia eletrônica, notaram alterações no hepatócito de coelhos, quando submetidos à anestesia pelo halotano.

Sabe-se que os anestésicos gerais, particularmente os halogenados, como o metoxifluoreno e o halotano, podem produzir alterações funcionais e lesão no fígado e nos rins do organismo adulto.

Os efeitos nefrotóxicos do halotano foram pela primeira vez relatados por Raventos (38). Sadove & Wallace (39), consideram que existe uma depressão de caráter reversível da função renal decorrente da anestesia com este agente.

Burnap et al. (6), Virtue et al. (53), Little et al. (27), Young et al. (58), Vourch et al (54), Tornetta (51), Chamberlain (8), Schmid (40,41), comentam significativa anormalidade da função hepática decorrente, atribuível à sensibilização pelo halotano, em um médico anestesista pelo simples contacto com o anestésico.

Combes (11) concorda com a possível sensibilização individual pelo halotano, citando um recente registro "Fulminant Hepatic Necrosis Surveillance Study", que indica ser este anestésico uma importante causa de necrose hepática fulminante.

Allan (2) conclui em seu trabalho, que o uso de halotano deverá ser evitado se um contacto prévio foi acompanhando de febre diferente, inexplicável, seguida de icterícia.

Dado aos poucos conhecimentos da ação do halotano sobre o fígado e os rins do embrião e do feto, propomo-nos a estudar, neste trabalho, a ação presumível desse agente sobre o fígado e rins de crias de ratas, através da observação histológica desses órgãos, como também, estudar a mortalidade dessas mesmas crias.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos em nossa experimentação, ratas (*Rattus Norvegicus Albinus*) adultas multíparas de idade entre 12 a 14 meses e, peso ao redor de 220 g oriundas de nosso biotério. Trata-se de animal de fácil obtenção, não oferecendo maiores problemas quanto ao acasalamento e à procriação, apresentando inclusive placentação semelhante à espécie humana. Acasalamos 50 ratas, na proporção de 1 para 1. O diagnós-

tico precoce de gravidez em ratas por meio de processo de fácil uso rotineiro, apresenta uma série de dificuldades (12). Neste trabalho, o teste de prenhez foi baseado nos trabalhos de Marshall (30). A gestação dessas ratas dura de 20 a 21 dias (19). Escolhemos o 19.º dia de prenhez, para submeter as ratas à anestesia pelo halotano, por nos parecer a época mais conveniente à realização do trabalho. O experimento em outro dia da gestação, anterior ao estabelecido, leva à hipótese de possível interferência da anestesia na evolução da prenhez.

Após 19 dias de gestação, as ratas foram divididas em 3 grupos:

Grupo A — 20 ratas submetidas à inalação pelo halotano a 1% mais oxigênio 6 litros/minuto, durante 60 minutos.

Grupo B — 20 ratas submetidas à inalação de oxigênio no mesmo fluxo do grupo A, durante 60 minutos.

Grupo C — 10 ratas não submetidas ao anestésico nem à maior concentração de oxigênio, foram mantidas nas condições habituais de criação.

As ratas dos grupos A e B eram colocadas em uma "Câmara de Anestesia", que consistia de uma campânula de vidro transparente com capacidade para 4.500 cm³, hermeticamente fechada com uma placa de isopor. Através dessa placa, passavam dois tubos plásticos, um dos quais ligado ao aparelho de anestesia (Fluotec Mark II) e conduzindo para dentro da campânula, halotano mais oxigênio ou simplesmente oxigênio. O outro tubo plástico servia para eliminar o excesso de gases do interior da campânula para o meio ambiente. Equilibrava-se assim, a pressão dentro da campânula, além de retirar da mistura gasosa exalada pelas ratas.

Encerrada esta parte do experimento, todas as ratas do grupo A, B e C foram observadas diariamente, até o término da gestação.

Ao nascerem as crias, observamos todas e anotamos o número de natimortas. A partir das primeiras horas de vida, foi sorteada uma cria de cada grupo e sacrificada, por golpeamento na cabeça. Em seguida, retiramos fígado e rins. O sacrifício foi repetido em dias sucessivos para todas as crias, uma de cada rata, diariamente, até a última, visando a observação progressiva de possíveis lesões dos órgãos em estudo.

Fixamos as peças durante 48 horas em formol tamponado de Lillie e incluídas em parafina. A seguir preparamos as lâminas de todas as peças, as quais foram submetidas à coloração pela hematoxilina de Carrazie, Eosina aquosa, Tricônio de Pierre Masson e P.A.S.

Devido à constância de aparecimento, nas preparações histológicas dos órgãos em estudo, de lesões do tipo vacuolização citoplasmática para o fígado, degeneração grânulo-hialina e degeneração vacuolar para os rins, foi adotado o critério de avaliação destas lesões de acordo com a sua intensidade, aplicando-se a seguinte classificação:

Fígado

Grau 1 (pequena intensidade): poucos hepatócitos afetados, próximos à veia centro-lobular, com o volume das células um pouco aumentado.

Grau 2 (média intensidade): todos os hepatócitos próximos à veia centro lobular estão afetado, com o aumento bem evidente de volume das células.

Grau 3 (grande intensidade): todos os hepatócitos da zona centro-lobular estão afetados e o volume celular nitidamente aumentado.

Rim (degeneração vacuolar)

Grau 1 (pequena intensidade): esparsos túbulos proximais com pequenos vacúolos.

Grau 2 (média intensidade): a maioria dos túbulos proximais com pequenos vacúolos.

Grau 3 (grande intensidade): a maioria dos túbulos proximais com vacúolos de tamanhos variados).

Rim (degeneração grânulo-hialina)

Grau 1 (pequena intensidade): esparsos túbulos com poucos grânulos.

Grau 2 (média intensidade): fina granulação na maioria dos túbulos.

Grau 3 (grande intensidade): granulação grosseira na maioria dos túbulos.

Dada a natureza da variável e o interesse na existência de relação entre o número de crias mortas e segundo os grupos considerados, bem como a presença de lesão nos órgãos estudados, usou-se o teste estatístico de partição do Qui-quadrado⁽¹⁰⁾. O nível de significância adotado em todas as comparações foi de 0.05 (5%).

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em itens que incluem:

1.º — O número de crias nascidas vivas ou mortas nos grupos A, B e C.

2.^o — A presença das alterações morfológicas nas preparações de fígado e rins das crias nascidas dos grupos A, B e C.

Mortalidade Fetal

Das 50 ratas programadas para o estudo, apenas 46 tiveram crias, pois 4 ratas do Grupo A morreram durante o experimento, por efeito do anestésico. O número total de crias foi de 350, assim distribuídas:

Grupo A — 124 crias
Grupo B — 155 crias
Grupo C — 71 crias

Dessas 350 crias, foi observada a seguinte natimortalidade:

Grupo A — 21 crias
Grupo B — 5 crias
Grupo C — 0 crias

Confrontamos os três grupos, quanto ao número de crias nascidas vivas e obtivemos o resultado exposto no gráfico I.

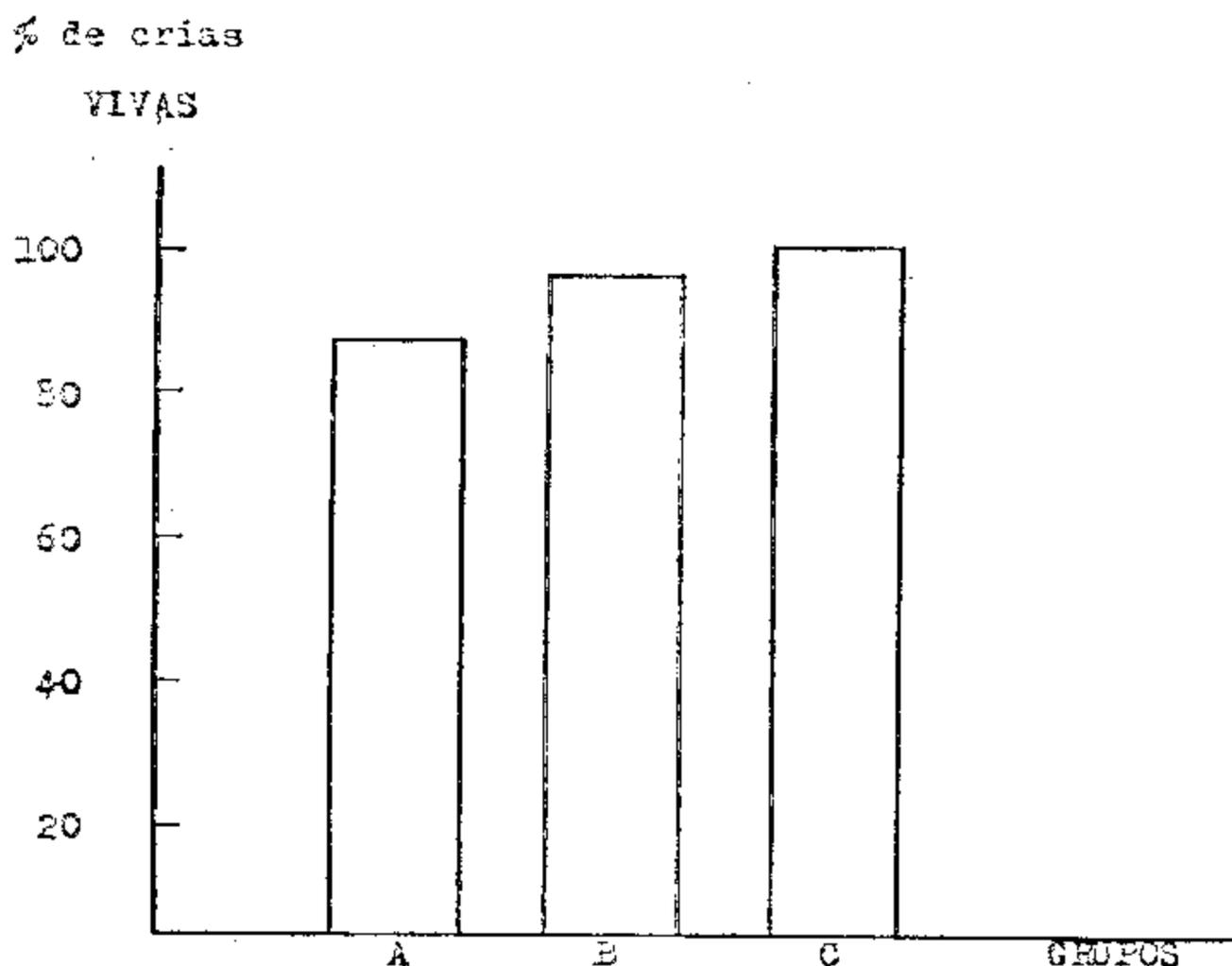


GRAFICO I

Distribuição dos percentuais de crias vivas em cada grupo.

*Estudo anátomo-patológico***A — Ocorrência de lesões**

Das 350 crias nascidas das ratas dos Grupos A, B e C obtivemos 337 lâminas para o estudo histopatológico.

Por defeito técnico de confecção, desprezamos 13 preparações. Para facilitar o estudo, fizemos preparações de fígado e rins (direito e esquerdo) de cada cria em uma mesma lâmina, economizando não somente o tempo de "leitura" das preparações contidas na lâmina, mas também a técnica de confecções das mesmas.

O número de lâminas e as respectivas preparações para cada grupo acham-se discriminadas a seguir:

Grupo A — 115 lâminas

115 preparações de fígado
115 preparações de rim direito
115 preparações de rim esquerdo

Grupo B — 151 lâminas

151 preparações de fígado
150 preparações de rim direito
150 preparações de rim esquerdo

Grupo C — 71 lâminas

71 preparações de fígado
71 preparações de rim direito
71 preparações de rim esquerdo

Total — 337 lâminas

No final das nossas observações histopatológicas das 337 preparações de fígado e rins, anotamos, com mais freqüência, a presença de alterações morfológicas hepáticas do tipo vacuolização citoplasmática (fig. 3) e alterações morfológicas renais do tipo degeneração grânulo-hialina (fig. 4) e degeneração vacuolar (fig. 5).

Embora tenhamos encontrado com freqüência estas lesões, a sua intensidade variou de preparação para preparação. Para melhor resultado de nossas observações, procuramos padronizar a intensidade das lesões em 3 graus, como foi exposto no capítulo de material e método.

(*) Perdemos uma preparação de rim direito e uma de rim esquerdo.

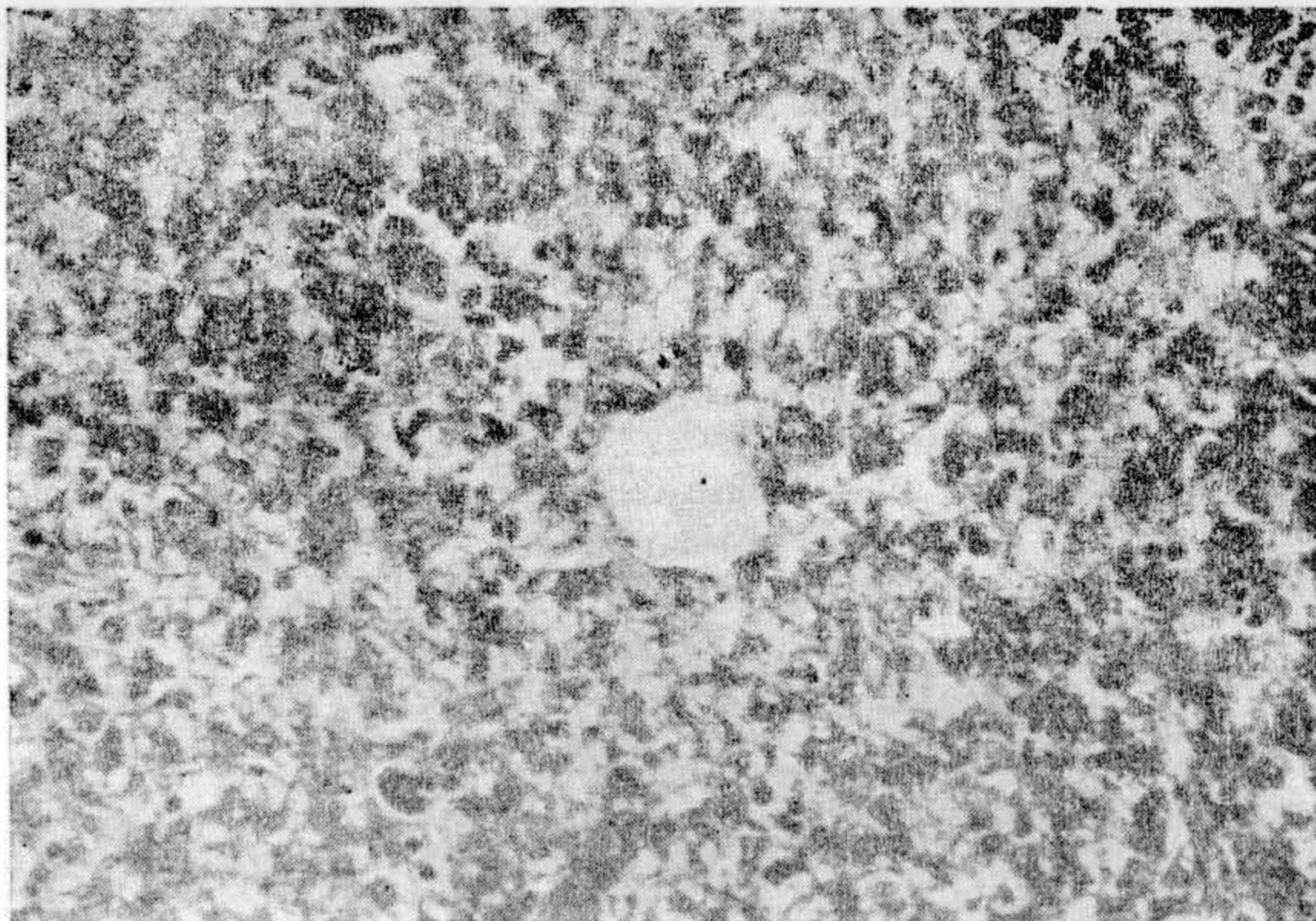


FIGURA 3
Lesão Hepática

Vacuolização citoplasmática.

(160 x T.P. Masson). Zona centro-lobular apresentando todos os hepatócitos, e vários hepatócitos da zona intermédio-lobular com vacúolos citoplasmáticos.

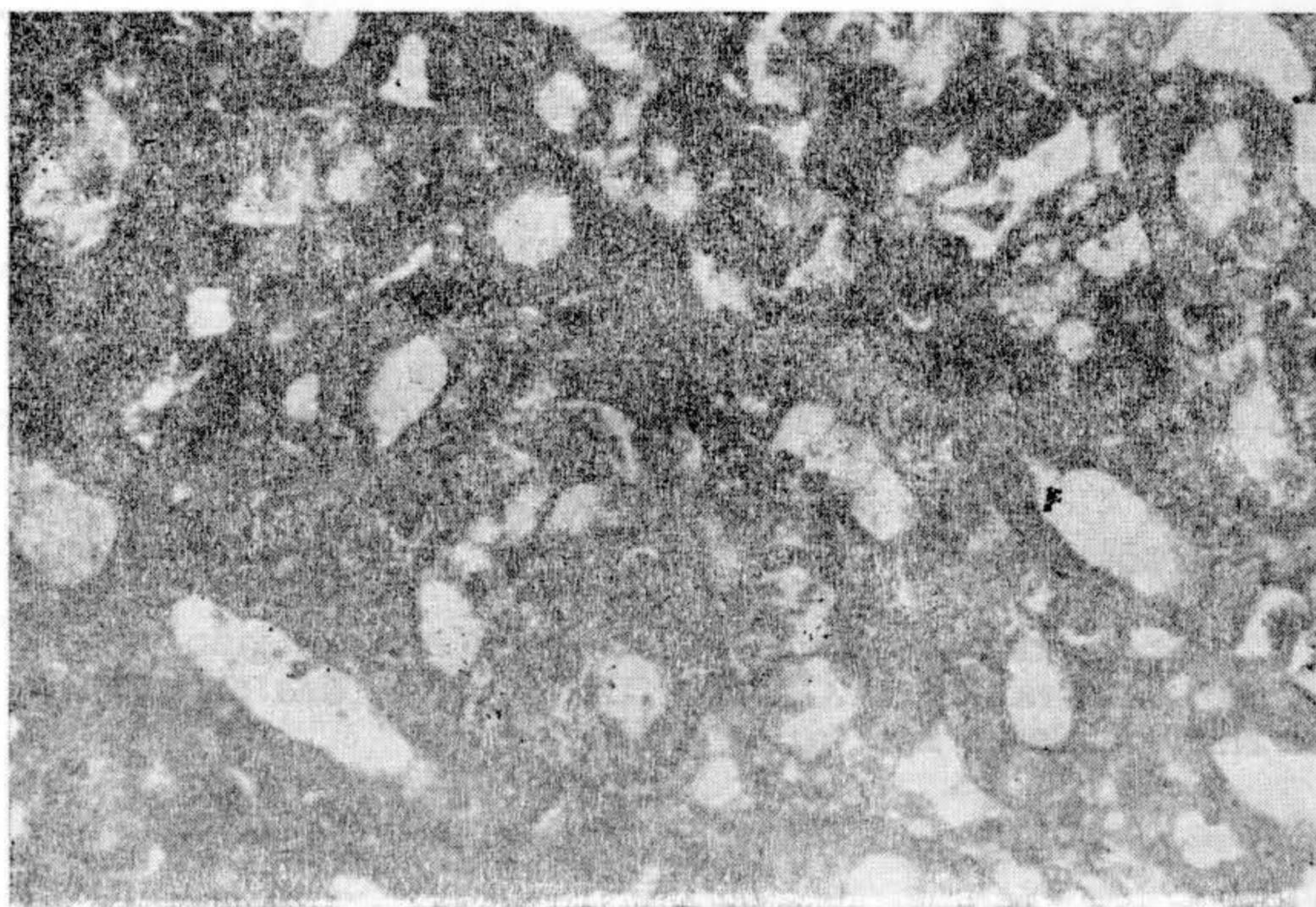


FIGURA 4
Lesão Renal

Degeneração grânulo-hialina.

(320 x col. P.A.S.). A maioria dos túbulos contornados nesse campo, mostram grosseira granulação hialina intra-citoplasmática.

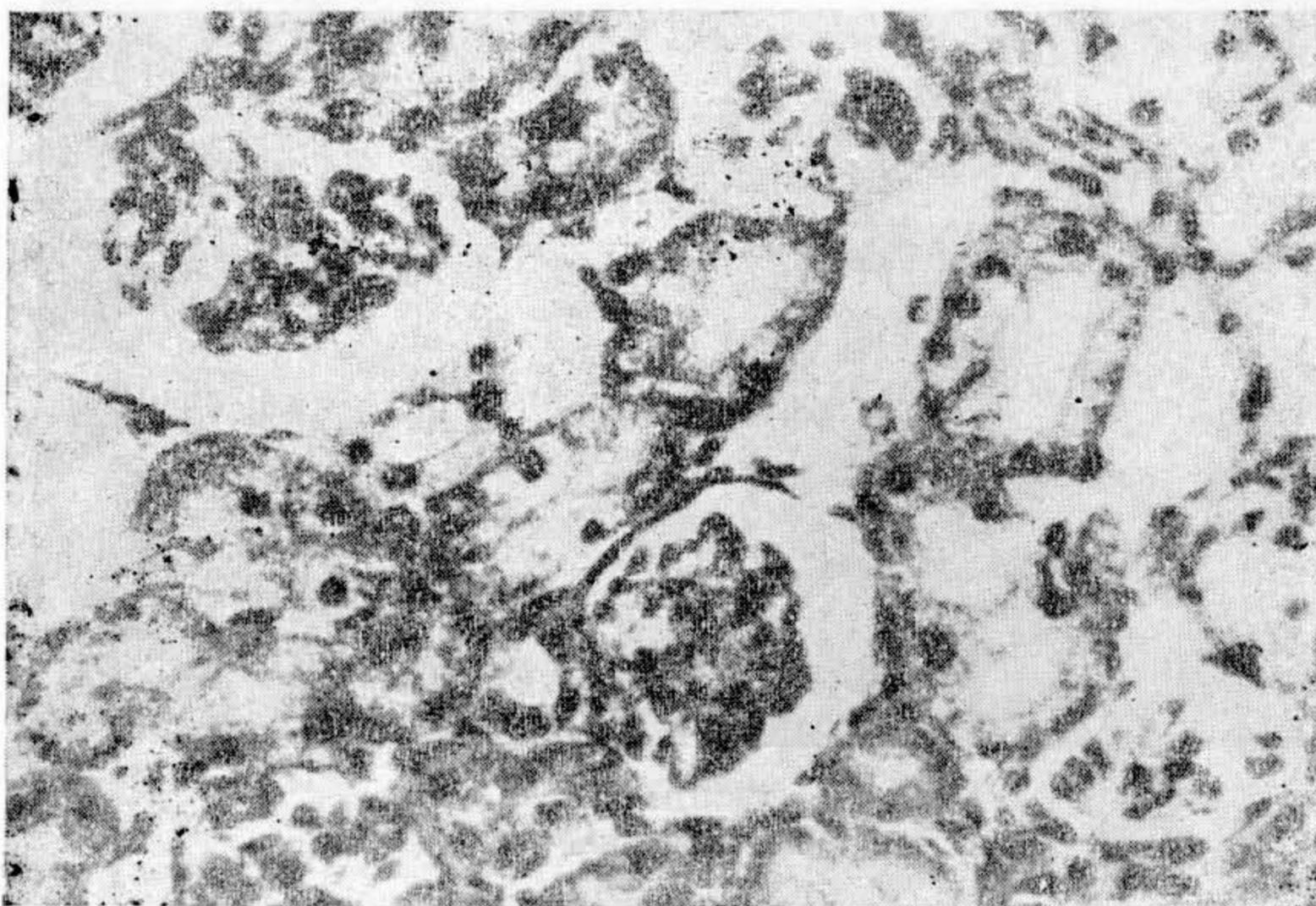


FIGURA 5

Lesão Renal

Degeneração Vacuolar.

(320 x col. T.P. Masson). Os túbulos proximais apresentados no campo mostram seus elementos com citoplasma claro e, às vezes rendilhado devido à intensa vacuolização.

B — Lesões Hepáticas

O gráfico II mostra a distribuição da proporção de lesão do tipo 1, 2 e 3 do fígado, para os 3 grupos estudados.

C — Lesões Renais

Usando para os rins o mesmo raciocínio já usado para o fígado, observamos no Gráfico III os valores das proporções de rim com lesão nos vários grupos.

COMENTÁRIOS

Os comentários que passaremos a fazer, dizem respeito à proposição de nosso trabalho. Procuraremos relacionar os resultados obtidos com fatos referidos na literatura selecionada.

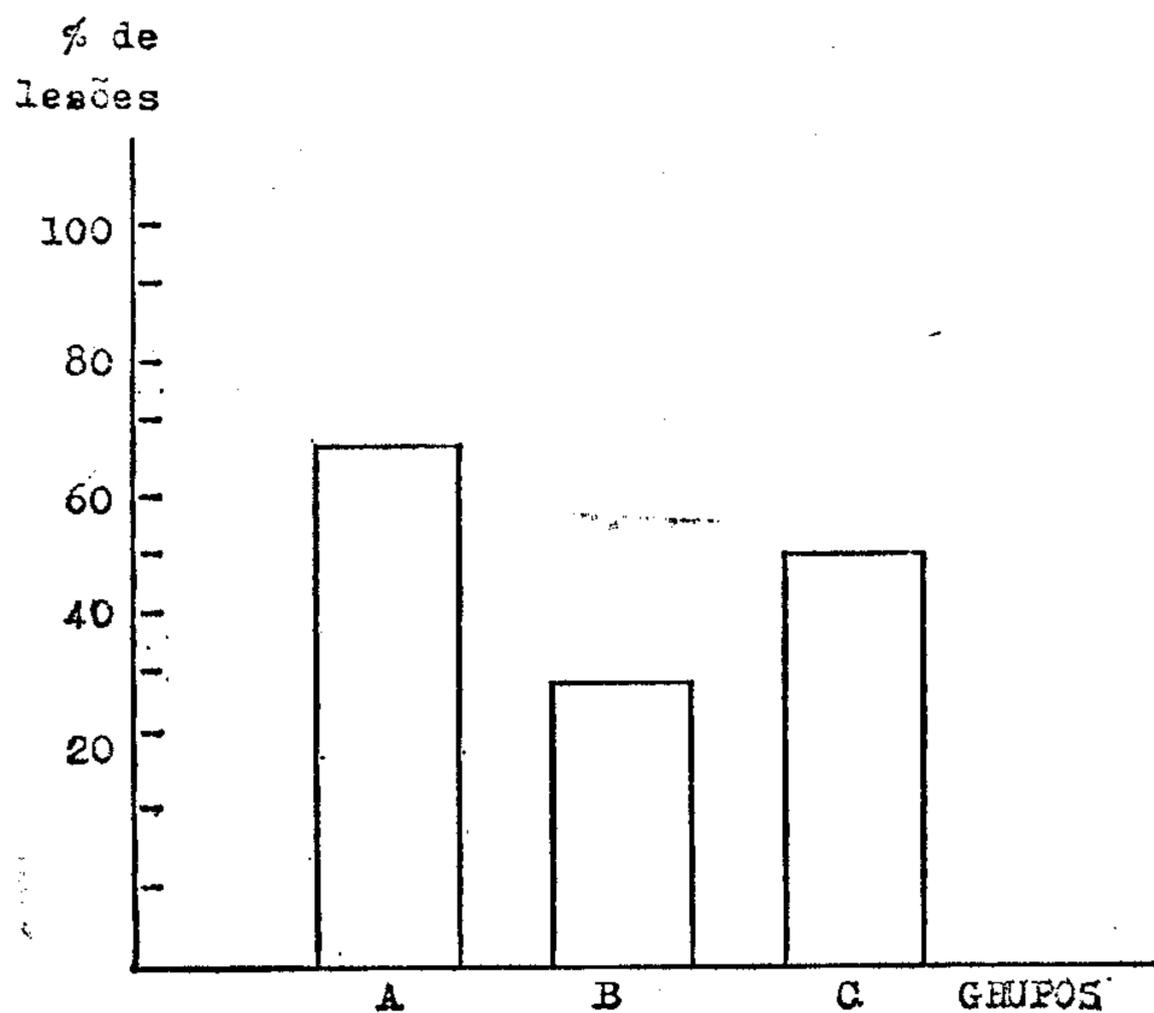


GRÁFICO II

Distribuição das porcentagens de lesão de fígado nos Grupos A,B,C.

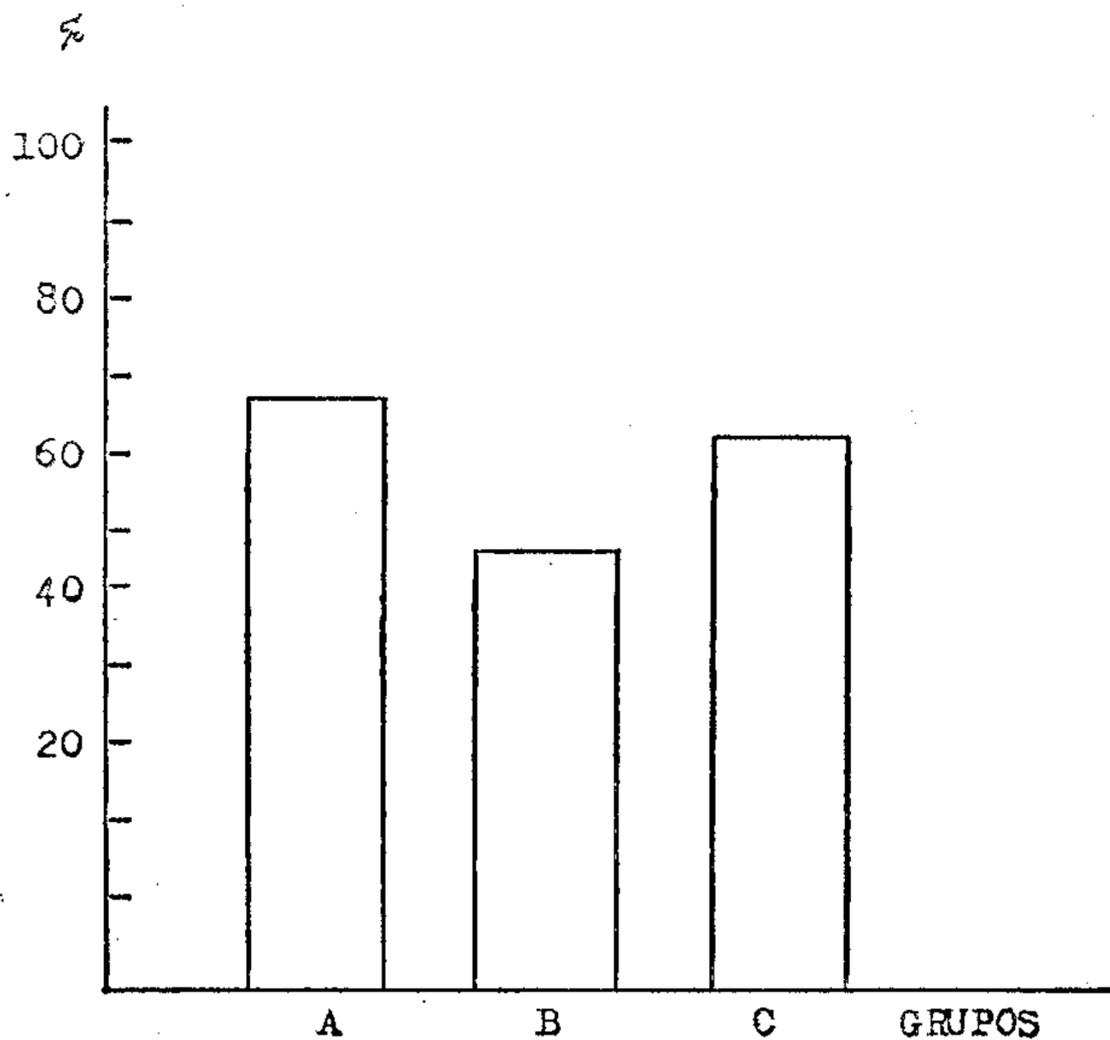


GRÁFICO III

Distribuição das porcentagens de lesão de rins nos Grupos A,B,C.

O motivo que nos levou a escolher o *Rattus norvegicus albinus* da raça Wistar como animal de experiência, foram as características que o definem em nosso meio, como animal de laboratório: fácil obtenção, uso constante em nossos trabalhos experimentais. Além destes fatores, consideramos também a facilidade de procriação e placentação, que muito se assemelha à placenta humana (26).

Durante a anestesia com halotano e oxigênio, a que foram submetidas as ratas prenhes do Grupo A, 4 ratas morreram, embora todas tenham sido submetidas a uma mesma concentração de halotano. Não era de se esperar tal ocorrência, motivada pelo agente anestésico, na concentração padronizada: a técnica utilizada não nos permitiu o controle das funções vitais dos animais.

As conseqüências de uma anestesia profunda com o halotano são fatais quando não assistida: depressão do centro respiratório redução do débito cardíaco e do volume minuto cardíaco, havendo conseqüentemente hipotensão por depressão miocárdica (29,35,45,55).

A avaliação das crias nascidas foi feita seguindo o critério de observação durante o dia de nascimento, separando as crias mortas. Num total de 350 crias nascidas dos Grupos A, B. e C, foi notada diferença significativa na natimortalidade do Grupo A, em relação aos Grupos B e C. Observações feitas por Bryce-Smith, (5) revelaram efeitos bradicardizantes do halotano sobre o feto; Montgomery, (33) em estudo comparativo feito com diferentes técnicas anestésicas conclui que o halotano produz depressão fetal. Flowers & Schneider (14) também confirmam este fato.

Moir (32) atentou para a hipotensão arterial materna, ocasionada quando da administração de halotano, levando a uma diminuição do fluxo placentário, com repercussão desastrosa para o feto. Hipotensões intensas e persistentes podem perturbar a circulação útero placentária, ocasionando alteração na transferência de fases e produzindo grave hipóxia fetal e hipercarbica. Estes fatores, embora usualmente não sejam fatais para os fetos em boas condições, podem ser o adicional crítico, causador da morte fetal, quando já existe perigo de vida devido às péssimas condições obstétricas (4). Parece-nos, pelo aspecto das crias, que a morte das mesmas ocorreu no início ou durante o trabalho de parto das ratas, e não anteriormente.

No estudo histopatológico nada observamos nas preparações de fígado nessas crias; entretanto, nas preparações de rins, foi observado degeneração hialina. Esta lesão não nos pareceu responsável pela mortalidade das crias, uma vez que

a encontramos na grande maioria das crias nascidas dos Grupos A, B e C.

No estudo histopatológico das preparações de fígado e rins das crias dos 3 Grupos, anotamos a presença de lesão hepática tipo vacuolização citoplasmática centro-lobular e alterações renais tipo degeneração vacuolar e degeneração grânulo-hialina.

Coletando o resultado final das preparações de fígado e rim, chamou-nos a atenção a incidência de lesões hepáticas e renais das crias do Grupo A em relação aos demais grupos.

Usando o teste estatístico do Qui-quadrado, calculamos, com o número de lesões freqüentes para cada órgão em estudo, e comprovamos que o Grupo A difere dos Grupos B e C, porém os Grupos B e C não diferem entre si quanto à presença de lesão hepática.

Trabalhos publicados sobre a possível hepatotoxicidade do halotano são discordantes, deixando pairar dúvidas sobre o assunto (1,2,6,7,8,9,11,17,18,21, 22,23,24,25,27,28,31,36,40,41, 43,48,49,50,51,52,53,54,58).

As lesões renais da mesma forma que a lesão hepática, apareceram mais intensamente nas crias do Grupo A.

Usando o teste estatístico do Qui-quadrado, constatamos aumento significativo das lesões do tipo degeneração vacuolar e degeneração grânulo-hialina no Grupo A, em relação aos Grupos B e C sem diferenças significativas entre os Grupos B e C.

Trabalhos publicados sobre a possível nefrotoxicidade do halotano também são discordantes (20,25,26,31,38,39,42,47,49,57).

O quadro histopatológico de degeneração vacuolar observado nos túbulos proximais enquadra-se na mesma fisiopatologia da vacuolização citoplasmática hepática: alteração do equilíbrio físico-químico do protoplasma celular, impedindo uma perfeita atuação enzimática energética ao nível da membrana celular na manutenção do equilíbrio de Donnan a uma entrada de sódio dentro da célula, levando consigo a água que iria depositar-se sob a forma de vacúolos, e aumentando o volume das células (28).

Entretanto, a patogenia da degeneração grânulo-hialina e seu real significado são ainda assuntos sujeitos à discussão e motivo de pesquisa.

Alguns aspectos, no entanto, são mais freqüentemente citados e demonstrados, como por Oliver et al. (36) e Sellers et al. (41). Estes autores sustentam que a origem dos grânulos está diretamente ligada à função normal e reabsorção protéica e que, na eventualidade de uma elevação de proteína no filtrado glomerular (proteinúria), estaria aumentada a reabsorção onde haveria incorporação aos mitocôndrios e formação dos grânulos hialinos.

Para Perez Tamayo (37) não seria propriamente uma lesão e sim um armazenamento por excesso de reabsorção que é estimulada por aumento da proteína reabsorvida.

A observação dos resultados referentes à mortalidade das crias conduz à consideração de que a inalação da mistura de halotano a 1% e oxigênio, praticamente a 99% leva a maior incidência que do grupo de ratas mantidas respirando O₂ puro. Haveria, pois proteção por parte do oxigênio, se considerada a comparação com oxigênio puro; importa não esquecer que o Grupo de maior mortalidade, das ratas submetidas ao halotano a 1% respirou o oxigênio em concentração quase idêntica ao do grupo de oxigênio puro.

Resta, pois, o fator halotano como agente, mesmo em concentração que se considera baixa. Todavia, é preciso assinalar que o grupo de ratas mantidas em ar ambiente foi o que apresentou maior porcentagem de crias vivas.

O estudo estatístico mostrou que há diferença significativa entre o grupo que respirou halotano e os dois outros, não havendo essas diferenças entre os Grupos que respiraram oxigênio e ar.

Implicações clínicas, humanas, não parecem cabíveis, a não ser aquelas que o simples bom senso indica: de que se impõem boa oxigenação e concentrações baixas do anestésico.

O estudo do aparecimento das lesões hepáticas e renais nos 3 grupos de experimento revelou maior incidência de lesões nas crias de ratas submetidas a halotano, e menor naquelas que respiram oxigênio puro. Todavia, a análise estatística mostrou que havia diferença significativa entre o grupo que recebeu oxigênio puro e os demais; mas que não ocorreria essa diferença entre as crias das ratas anestesiadas com halotano e aquelas mantidas em ar.

CONCLUSÕES

A administração de halotano a 1% e oxigênio a 99% a ratas no 19.º dia de gravidez, em relação a outros animais submetidos a oxigênio a 100% e as ratas mantidas em ar, nas mesmas condições habituais de parto, trouxe como resultado as seguintes diferenças observadas nas respectivas crias:

1 — Ocorreu maior mortalidade nas crias de ratas submetidas a halotano, não tendo havido diferença significativa entre as crias de ratas mantidas em oxigênio puro e as mantidas em ar.

2 — Ocorreram lesões de diferente intensidade no fígado e rins das crias dos três grupos de ratas, inclusive, pois, nas crias de ratas mantidas em ar.

3 — As lesões do fígado e dos rins foram mais frequentes nas crias das ratas submetidas a halotano, não havendo diferença significativa entre esse grupo e o das ratas mantidas em ar.

4 — As lesões das crias das ratas submetidas a oxigênio durante o mesmo tempo e nas mesmas condições daquelas submetidas a halotano foram menos frequentes que as dos outros dois grupos.

5 — O estudo da mortalidade e das lesões hepáticas e renais verificadas nas crias de ratas submetidas a halotano a 1%, a oxigênio puro nas mesmas condições, ou mantidas em ar, leva à conclusão de efeito tóxico desse agente anestésico.

SUMMARY

THE ACTION OF HALOTHANE ADMINISTERED AT THE END OF PREGNANCY ON THE LIVER AND KIDNEYS OF THE NEW-BORN RATS. A STUDY OF MORTALITY AND HISTOPATHOLOGY

A group of fifty female pregnant rats (*Rattus Norvegicus albinus*), divided in three groups were studied. On the 19th day of pregnancy (usual length of pregnancy 20 to 21 days) group A (20) rats were subjected to 1% halothane in oxygen for 1 hour. Four rats died during exposure. 20 (group B) rats were also submitted to a one hour exposure to 100% oxygen while 10 rats were used for control.

The incidence of stillborn rats was greater in the group subjected to halothane, although these stillborn did not show an increased incidence of liver or kidney lesions.

Every day a young of each group was sacrificed and liver and kidneys were removed for histopathological studies. These showed evidence of an increased incidence of hepatic lesions of the newborns of females treated with 1% halothane, while there was no difference between the group exposed to 100% oxygen and the control.

REFERÊNCIAS

1. Abajian Jr J, Brazell E H, Dente G A & Mills E L — Preliminary clinical appraisal of fluothane. *Anesthesiology* 19:93, 1958.
2. Allen H L — Halothane and liver damage. *New Engl J Med* 280:562, 1969.
3. Andersen N B — The toxic and teratogenic effect of cyclopropane in chicken embryos. In: Fink B R ed — *Toxicity of Anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 294:307, 1968.
4. Bonica J J — *Principles and Practice of Obstetric Analgesia and Anesthesia*. Philadelphia, F A Davis, 1967. 2v.
5. Bryce-Smith R apud Sadove M S & Wallace V E p 96.
6. Burnap T K, Galla S J & Vandam L D — Anesthetic, circulatory and respiratory effects of fluothane. *Anesthesiology* 19:307-20, 1958.
7. Burns T H, Mushin W W, Organe G S & Robertson J D — Clinical investigations of fluothane. *Brit Med J* 2:483-8, 1957.
8. Chamberlain G — Liver damage after halothane anesthesia. *Brit Med J* 2:1524-5, 1963.
9. Christie G S & Judah J D — Mechanism of action carbon tetrachloride on liver cells. *Proc Roy Soc B* 142:241-57, 1954.

10. Cochran W G — Some methods for strengthening the common X2 test. *Biometrics* 10:417-51, 1954.
11. Combes B — Halothane-included liver damage: an entity. *New Engl J Med* 280:558-9, 1969.
12. Corbett C E — Estudos relacionados com a ação de drogas na gestação. 1. Diagnóstico e controle da gravidez em ratas. *An Fac Med Univ S Paulo* 24:95-129, 1948/49.
13. Fink B R, Shepard T H & Blandau R J — Teratogenic activity of nitrous oxide. *Nature (Lond.)* 214:146-8, 1967.
14. Flowers Jr C E & Shnider S M — Effects of labor, delivery and drugs on the fetus and newborn. In: Shnider S M ed — *Obstetrical Anesthesia*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1970 pg 37-48.
15. Geretto P — Ação teratogênica do fluotane no rato. (*Rattus norvegicus albinus*). São Paulo, 1971. (Tese — Escola Paulista de Medicina).
16. Geretto P, Hayashi H & Castro N D de — Ação teratogênica da anestesia pelo 2-bromo, 2-cloro, 1-trifluoroetano (fluothano) em ratas (*Rattus norvegicus albinus*) no período inicial da prenhez. *Rev Paul Med* 69:313, 1959.
17. Gibson J A — Fluothane toxicity: pathological studies of mouse liver and kidney. *Canad Anaesth Soc J* 6:148-52, 1959.
18. Gopinath C, Jones R S & Ford E J H — The effect of the repeated administration of halothane on the liver of the horse. *J Path* 102:107-14, 1970.
19. Griffith J W & Farris E J ed — *The Rat in Laboratory Investigation*. Philadelphia, Lippincott, 1942. 448 p.
20. Hudon F, Jacques A, Clavet M & Houde J — Clinical observations of fluothane anaesthesia. *Canad Anaesth Soc J* 4:221-34, 1957.
21. Johnstone M — A clinical assessment of halothane (fluothane). *Anaesthesia* 13:196-7, 1958.
22. Johnstone M — Action du fluothane sur le foie. *Anesth Analg Réanim* 19:77-84, 1962.
23. Jones W N, Margolis G & Stephen C R — Hepatotoxicity of inhalation of anesthetic drugs. *Anesthesiology* 19:715-23, 1958.
24. Klatskin G & Kimberg D V — Recurrent hepatitis attributable to halothane sensitization in an anesthetist. *New Engl J Med* 280:515-22, 1969.
25. Krantz Jr J C, Park C S, Truitt Jr E B & Ling A S — Anesthesia 57: a further study of the anesthetic properties of 1,1,1 tri-fluoro 2,2, bromo-chloro-ethane (Fluothane). *Anesthesiology* 19:38-44, 1958.
26. Lapointe A & Bele-Binda N — Nephrotoxicité associée au methoxyflurane. *Canad Anaesth Soc J* 17:145-56, 1970.
27. Little Jr D M, Barbour C M & Given J B — The effect of fluothane, cyclopropane and ether anesthetics on liver function. *Surg Gynec Obstet* 107:712-8, 1958.
28. Maffei W E — Os fundamentos da Medicina. São Paulo, Prociencx 1967/68. pt 2, p 9.
29. Mahaffey J E, Aldinger E E, Sprouse J H, Darby T D & Thrower W B — The cardiovascular effects of halothane. *Anesthesiology* 22:982-6, 1961.
30. Marshall F H A, Gramer W, Lothhead J, Shearer C R — *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. London, Longman, 1922, p 564.
31. Mignault G, Labreque B & Hamel S — Methoxyflurane et nephrotoxicite: étude de la fonction renale de 22 malades anesthésiés au methoxyflurane. *Canad Anaesth Soc J* 17:331-40, 1970.
32. Moir D D — Anesthesia for caesarean section. An evaluation of a method using low concentrations of halothane and 50% of oxygen. *Brit J Anaesth* 42:136-42, 1970.
33. Montgomery J B — The effect of halothane on the newborn infant delivered by caesarean section. *Brit J Anaesth* 33:156-60, 1961.
34. Morris L E — Comparison studies of hepatic function following anesthesia with the halogenated agents. *Anesthesiology* 21:109-10, 1960.

35. Morrow D H & Morrow A G — The effects of halothane on myocardial contractile force and vascular resistance. Direct observations made in patients during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 22:537-41, 1961.
36. Oliver J, Strauss W, Kretchmer N, Lee Y C, Dickerman H W & Cherot F apud Perez Tamayo R p 12.
37. Perez Tamayo R — Principios de Patologia. México, Prensa Médica Mexicana, 1961, 620 p.
38. Raventos J — The action of fluothane: a new volatile anaesthetic. *Brit J Pharmacol* 11:394-410, 1956.
39. Sadove M S & Wallace V E — Halothane. Philadelphia F A Davis, 1962. 496 p.
40. Schmid M — Benign postoperative intra-hepatic cholestasis. *New Engl J Med* 272:545-50, 1965.
41. Schmid M — Zur Frage der sogenannten Halothan-Hepatitis. *Schweiz Med Wschr.* 96:893-5, 1966.
42. Schoeffel M E, Arean V M & Gravenstein J S — Liver and kidney damage for anesthesia. *Sth Med J* 58:198-204, 1965.
43. Schweikert C H & Kapfhammer V — Zur frage der hepatotoxicitat des halothane. *Anaesthetist* 14:74-9, 1965.
44. Sellers A L, Griggs N, Marmorston J & Goodman H C apud Allen A C p 338.
45. Severinghaus J W & Cullen S C — Deppression of myocardium and body oxigen consumption with fluothane. *Anesthesiology* 19:165-77, 1958.
46. Snegireff S L, Cox J R & Eastwood D W — The effect of nitrous oxide, cyclopropane or halothane on neural tube mitotic index, weight, mortality and gross anomaly rate in the developing chick embryo. In: Fink B R ed. *Toxicity of Anesthetics*. Baltimore, Williams & Wilkins, 279:93, 1968.
47. Spence A A, Linton A L & Patel, A R — The influence on renal function of chloroform and halothane anaesthesia in man. *Brit J Anaesth* 39:789-93, 1967.
48. Stephen C R, Bourgeois-Gavardin M, Fabian L W, Grosskreutz D C, Dent S & Coughlin J — Fluothane: a preliminary report. *Anesthesiology* 18:174-5, 1957.
49. Stephen C R, Grosskreutz D C, Lawrence J H, Fabian L W, Bourgeois-Gavardin M & Coughlin J — Evaluation of fluothane for clinical anaesthesia. *Canad Anaesth Soc J* 4:246-58, 1957.
50. Stephen C R, Margolis G, Fabian L W & Bourgeois-Gavardin M — Laboratory observations with fluothane. *Anesthesiology* 19:770-81, 1958.
51. Tornetta F J — Halothane jaundice and hepatotoxicity. *J Amer Med Ass* 184:658-60, 1963.
52. Trevino Garcia Manzo N, Muzquiz Soberon R, Aguirre Garcia J & Guerrero Alcazar M — Efecto del halothano en el hígado del perro. *Prensa Méd Mex* 34:423-30, 1969.
53. Virtue R W, Payne K W, Caranna L J, Gordon G S & Rember R R — Observations during experimental and clinical use of fluothane. *Anesthesiology* 19:478-87, 1958.
54. Voure'h G, Schndebelen E, Buck F & Fruhling L — Fatal acute hepatonephritis after anesthesia including halothane (fluothane). *Anesth Analg Réanim.* 17:466-75, 1960.
55. Wenthe F M, Patrick R T & Wood E H — Effects of anesthesia with halothane on the human circulation. *Anesth Analg Curr Res* 41:381-90, 1962.
56. Wimsatt W A — Some aspects of the comparative anatomy of the mammalian placenta. *Amer J Obstet Gynec* 84:1568-94, 1962.
57. Wyant G M, Merriman J E, Kilduff C J & Thomas E T — The cardiovascular effects of halothane. *Canad Anaesth Soc J* 5:384-402, 1958.
58. Young T M, Mezistrano J S, Carson S A A & Morris L E — Effect of anesthesia on previously irradiated small animals. *Fed Proc.* 19:274, 1960.