

## EFEITO DO HALOTANO SOBRE O FÍGADO DE RATOS

### I — Indução Enzimática Microsomal.

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

**DR. PAULO MELLO SOARES (\*\*)**

**DR. ADOLPHO MAX ROTSCCHILD (\*\*\*)**

*Os efeitos da inalação repetitiva de concentrações subanestésicas de halotano foram estudados em 10 ratos, expostos ao anestésico durante 7 dias consecutivos, por um período diário de 2 horas. O grupo controle, constituído de 10 ratos, foi submetido à inalação de oxigênio a 100%, nas mesmas condições experimentais.*

*As alterações funcionais, avaliadas experimentalmente pelo consumo de barbiturato "in vitro", traduzem a ocorrência do fenômeno de indução microsomal enzimática no fígado dos animais tratados com halotano.*

*Os autores discutem o resultado procurando relacioná-los com a "poluição" das salas cirúrgicas por traços residuais de anestésicos voláteis.*

Até 1964, acreditava-se que os anestésicos inalatórios em uso clínico, com exceção do tricloroetileno, fossem biologicamente inertes ainda que farmacologicamente ativos (53). Os trabalhos de Van Dyke et al (66, 67), demonstrando que todos os anestésicos inalatórios até então empregados sofriam biotransformação, abriram perspectivas para o estudo da biologia celular em anestesia, visando encontrar explicação dos fenômenos de toxicidade muitas vezes observados com certos agentes halogenados, especialmente o halotano (1-1-1-triflúor-2-cloro-2-bromoetano).

Os trabalhos de Rehder et al (54) vieram demonstrar que aproximadamente 20% do halotano inalado sofre metaboli-

(\*) Anestesiologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

(\*\*) Prof. Assistente Doutor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

(\*\*\*) Prof. Adjunto do Departamento Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

AP 1782

1465

zação no fígado, resultando em produtos não voláteis. Dos sub-produtos, o ácido trifluoracético seria bioquimicamente o mais ativo, podendo interagir com proteínas, polipeptídeos e amino-ácidos (5, 30). Cohen et al (20) sugerem que os derivados fluorados do halotano se ligariam a estruturas celulares, constituindo metabolitos não voláteis, demonstrados por técnicas auto-radiográficas principalmente no fígado, de onde seriam lentamente eliminados, durante um período de vários dias. Como consequência deste processo de eliminação lenta, nos casos de exposição repetitiva à droga, ocorreria, no fígado, concentrações crescentes dos produtos de degradação, os quais poderiam então desempenhar um papel toxicológico importante.

No homem e em certos animais, como os roedores, existe um sistema localizado na fração do retículo endoplasmático, de diversos tecidos — especialmente no fígado — denominado *sistema microsomal enzimático*, capaz de agir sobre extensa variedade estrutural de compostos químicos, agentes tóxicos e drogas (47). As suas funções se prendem à degradação biológica das substâncias estranhas, abolindo ou reduzindo suas ações farmacológicas, e à conversão de compostos quimicamente lipofílicos em derivados polares, os quais, sendo hidrossolúveis, poderão ser eliminados pelos rins. Klingenberg (41) e Garfinkel (32) demonstraram, independentemente, em 1958, que o sistema microsomal hepático contém um pigmento que apresenta absorção óptica na faixa de 450 m $\mu$ , quando reduzido e combinado com o monóxido de carbono. Omura et al (52) caracterizaram a natureza hemo?protéica deste pigmento e o denominaram de citocromo P-450. O Sistema enzimático de que participa este pigmento é capaz de metabolizar uma grande variedade de compostos estruturalmente diferentes. Sua atividade pode ser estimulada por mais de duzentas drogas, dentre as quais carcinógenos, inseticidas, hormônios e outros compostos, químicos. O processo determinante do aumento da atividade deste sistema, responsável pela metabolização das drogas, ao nível celular, é denominado de *indução enzimática microsomal*. Sua importância é fundamental porque dele dependem, em muitos casos, a duração e intensidades dos efeitos farmacológicos de substâncias xenobióticas no homem e nos animais (22,46).

Recentemente, os pesquisadores têm dado ênfase particular aos anestésicos inalatórios, especialmente os halogenados, como possíveis determinantes de indução microsomal hepática.

A transformação biológica e o metabolismo acelerado dos anestésicos inalatórios pelo mecanismo da indução apresen-

ta mais que um interesse estritamente acadêmico. É bem plausível que a toxicidade ocasionalmente produzida no homem por estes agentes possa estar relacionadas com tais efeitos (21); poderia por exemplo, estar ligada à produção de metabolitos tóxicos, ou, alternativamente, à formação de radicais livres, que por combinação com proteínas formariam haptenos sensibilizantes (48, 62). Tanto um como outro destes mecanismos poderia tornar-se mais evidente na presença de enzimas microsomais induzidas (10).

As implicações clínicas da inalação crônica de doses sub-anestésicas de vapores ainda não estão bem estabelecidas. "Sensibilização" de anesthesiologistas ao halotano tem sido descrita por vários autores (12,40). Infelizmente, estes casos não foram estudados, no que se refere à atividade enzimática microsomal induzida e, sob este aspecto, a questão permanece em aberto (10).

Outro aspecto do problema se refere à gravidade do risco a que estão submetidos os indivíduos expostos pelos gases anestésicos nas salas cirúrgicas. Isto deve merecer especial atenção, especialmente em nosso meio, onde os sistemas de anestesia sem reinalação são os mais usuais. Existe sempre a possibilidade de que a inalação repetitiva desses vapores, resultando em indução microsomal hepática, leve a uma maior velocidade de produção de metabolitos das drogas anestésicas, com conseqüente citotoxicidade aumentada.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a ocorrência ou não do fenômeno da indução microsomal hepática conseqüente à inalação repetitiva de concentrações sub-anestésicas de halotano, sendo que na impossibilidade técnica de realizá-lo no homem, o animal de experimentação escolhido foi o rato.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 (vinte) ratos machos, da raça Sprague-Dawley pesando aproximadamente 200 gramas e colocados individualmente em uma câmara de vidro especialmente construída para a administração de uma mistura gasosa de oxigênio e anestésico a pequenos animais. O anestésico era administrado por um vaporizador calibrado de Takaoka, modelo Fluovapor 1.200, acoplado ao orifício de entrada da câmara. O orifício de saída da câmara permanecia em contato com o exterior, permitindo livre saída da mistura gasosa. O anestésico utilizado foi o halotano, cuja concentração no interior da câmara foi mantida constante e controlada em um valor de 0,25% através de um aparelho Fluotest modelo 90 de Takaoka, conservando-se a temperatura em todos os

experimentos, em aproximadamente 25°C. Para evitar-se uma eventual reinalação de gás carbônico no interior da câmara, colocou-se cal sodada em grânulos em uma quantidade que seguramente excedia de várias vezes à necessidade para reabsorção de CO<sub>2</sub> da câmara — (Fig. 1).

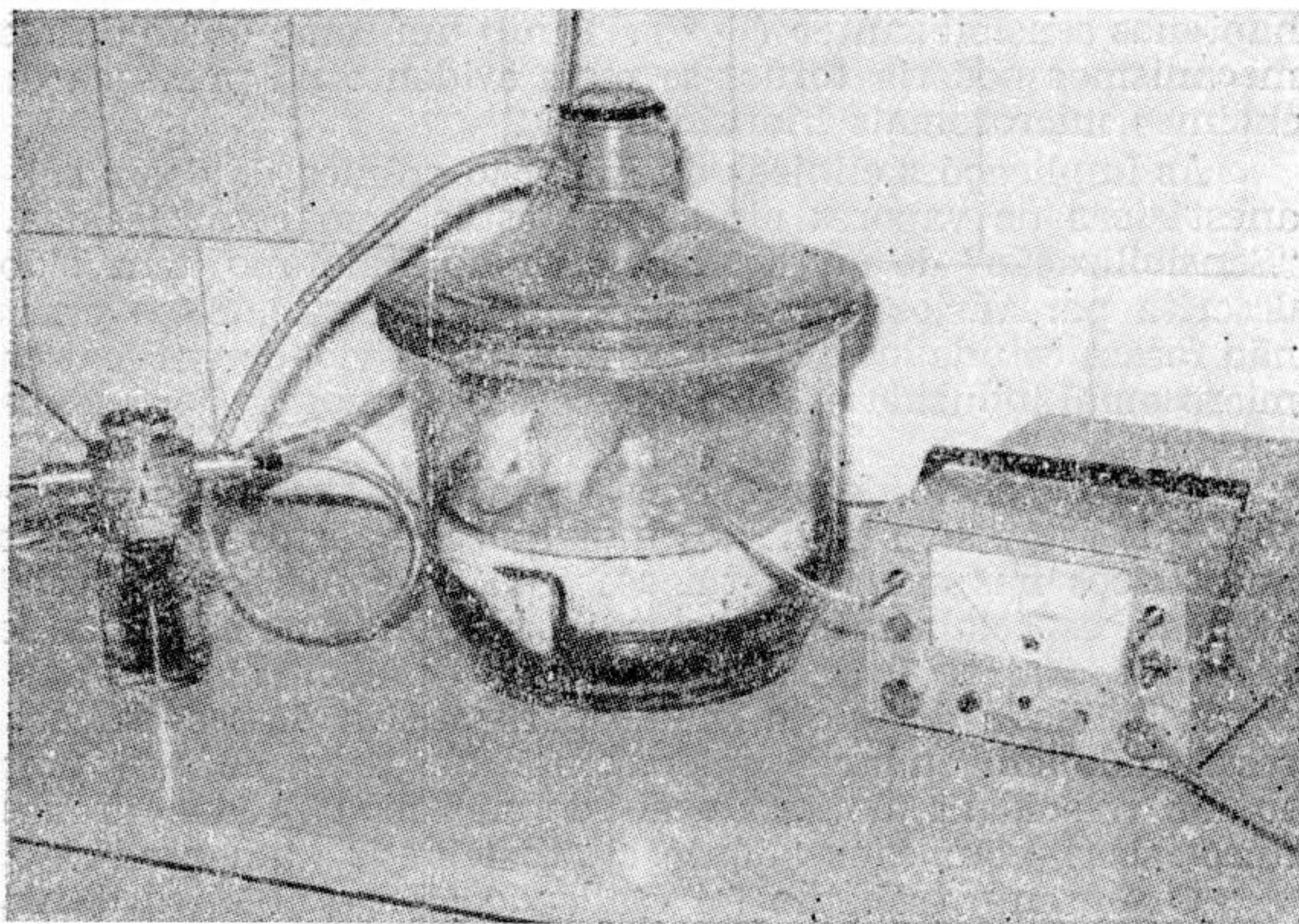


FIGURA 1

Sistema utilizado para exposição dos animais ao anestésico inalatório (ver explicação no texto).

Os animais foram divididos em 2 grupos:

*Grupo I — Controle* — Constituído de 10 ratos machos, expostos à inalação de oxigênio, administrado com um fluxo de 5 l/min, durante 2 horas por dia, durante 7 dias consecutivos, com um intervalo de 24 horas entre as exposições.

*Grupo II — Tratado* — Constituído de 10 ratos machos expostos à inalação de uma mistura de oxigênio (5 l/m) e halotano na concentração de 0,25%, durante 2 horas por dia, durante 7 dias consecutivos, sempre com um intervalo de 24 horas entre as exposições.

*Estudo de Atividade Microsomal "In Vitro"*: — Na manhã do 8º dia, ou seja 24 horas após a última exposição à mistura inalatória, um par de ratos (1 do grupo controle e 1 do grupo tratado com halotano) era sacrificado por decapitação e exsanguinado. Rapidamente seus fígados eram retirados, pesados e submetidos à homogeneização e centrifugação sob

refrigeração (centrífuga Sorvall a 5°C) a 9000 g., durante 15 minutos <sup>(60)</sup>.

A substância utilizada como droga indicadora da atividade enzimática microsomal hepática induzida foi o nembutal <sup>(55, 56)</sup>, sendo os resultados do presente estudo expressos em termos de microgramas de nembutal consumido, por grama de homogeneizados por hora (ug/g/h).

Para a determinação quantitativa do barbiturato presente após as induções foi empregado uma variação do método de Goldbaum <sup>(36)</sup> descrito por Sunshine <sup>(64)</sup>, que se baseia nas características de absorção ultra-violeta dos derivados de ácido barbitúrico. Procedeu-se a leitura da densidade óptica no espectrofotômetro de Zeisa, modelo PMQ-II utilizando-se o comprimento de onda de 260 nanômetros (nm), contra o branco correspondente.

Foi feita análise estatística dos resultados, empregando-se o teste t (Student) para amostras não pareadas. O nível de  $P < 0,01$  foi selecionado para representar diferenças significativas entre as médias <sup>(63)</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas numeradas de I a IV e no gráfico I.

Na tabela I verificamos que os valores de consumo de nembutal (X) pelos homogeneizados dos fígados dos ratos do grupo controle, apresentaram a seguinte variação:  $7,2 \leq X \leq 24,17\%$ . Por outro lado, na tabela II verificamos que o consumo porcentual de nembutal (Y) pelos homoge-

TABELA I

CONSUMO (\*) PORCENTUAL DE NEMBUTAL (X) EM HOMOGENEIZADOS DE FIGADO DE RATOS DO GRUPO I

Ratos do Grupo I	Consumo porcentual de Nembutal (X)
1	20,63%
2	20,85%
3	24,17%
4	18,51%
5	14,97%
6	15,11%
7	16,25%
8	7,2%
9	8,9%
10	12,35%

(\*) Calculado pela diferença entre os valores das concentrações de Nembutal encontradas nas amostras de 2 horas ( $X_2$ ) e na amostras de zero hora ( $X_0$ ).

TABELA II

CONSUMO (\*) PORCENTUAL DE NEMBUTAL (Y) EM HOMOGENEIZADOS DE FIGADO DE RATOS TRATADOS COM HALOTANO

Ratos Tratados	Consumo porcentual de Nembutal (Y)
1	61,3%
2	62,5%
3	56,66%
4	51,64%
5	42,25%
6	46,5%
7	33,73%
8	52,5%
9	46,2%
10	48,3%

(\*) Calculado pela diferença entre os valores das concentrações de Nembutal encontradas nas amostras de 2 horas ( $Y_2$ ) e nas amostras de zero hora ( $Y_0$ ).

neizados dos fígados dos ratos do grupo tratado, apresentaram a seguinte variação:

$$33,73\% \leq Y \leq 62,5\% .$$

A tabela III apresenta a média dos valores de consumo e médio dos consumos porcentuais de nembutal para os ho-

TABELA III

MÉDIA DOS VALORES DE CONSUMO E MÉDIAS DOS CONSUMOS PORCENTUAIS DE NEMBUTAL PARA OS HOMOGENEIZADOS DOS FIGADOS DOS GRUPOS I E II, E RESPECTIVOS ERROS PADRÕES DAS MÉDIAS

Grupo	Média do consumo (ug/h/g)	Média do consumo porcentual (%)
I	14,0 ± 0,89 *	15,9 ± 1,23 *
II	4,20 ± 3,10 *	47,7 ± 0,87 *

\* Erro padrão da média.

mogeneizados dos fígados para ambos os grupos de animais. Aplicado o teste t (Student) para comparação entre as médias dos grupos, verificamos na tabela IV resultados estatísticos altamente significativos, para a probabilidade de  $p < 0,01$ .

TABELA IV

X — Y	t *	tc ** (P 0,01)
42 — 14	8,2	2,88

\* t obtido

\*\* t crítico (18 graus de liberdade).

No gráfico I apresentamos em conjunto uma visão panorâmica das diferenças de consumo de nembutal (droga indicadora da atividade microsomal) entre os 2 grupos de animais.

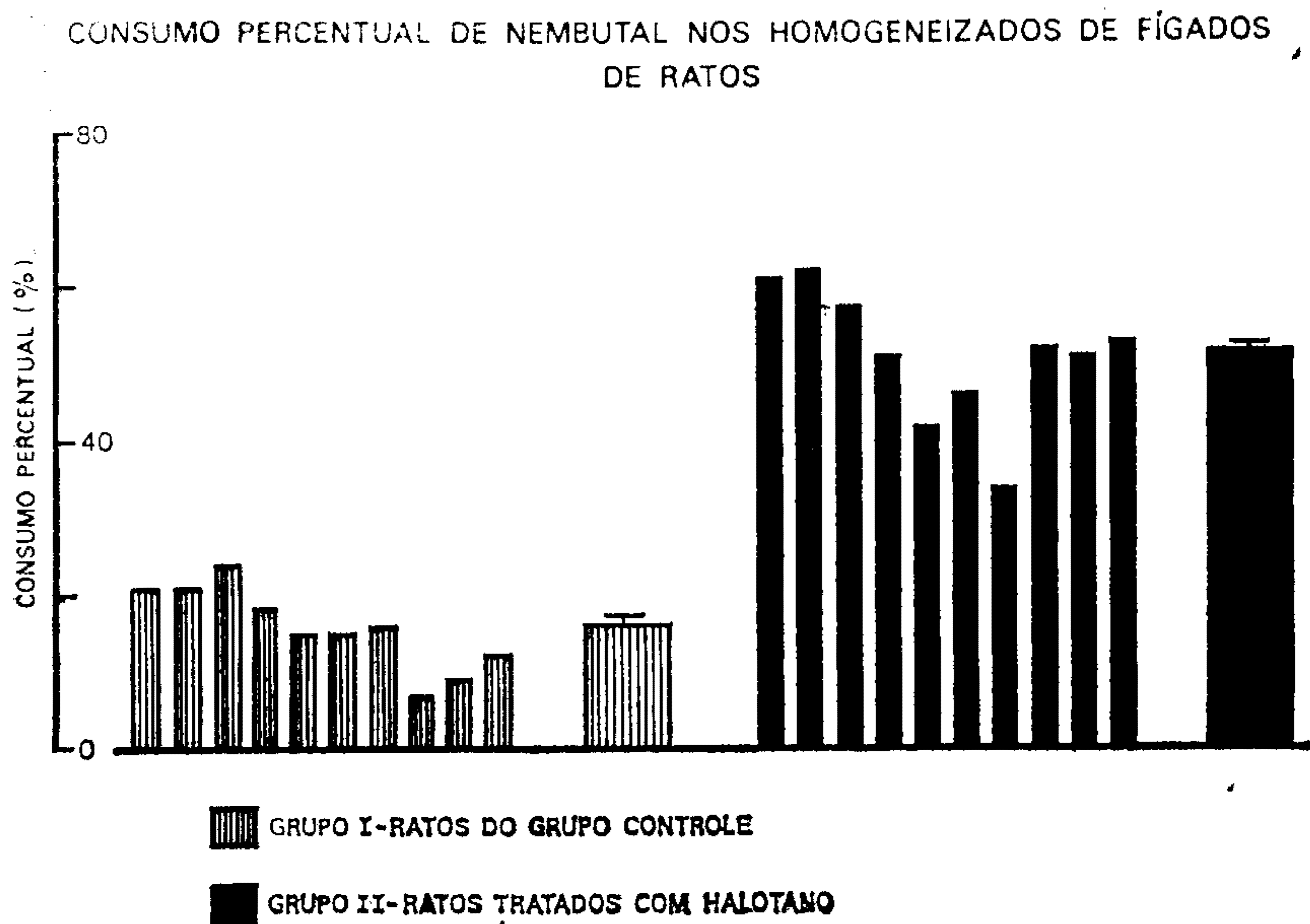


GRAFICO 1

Barras estreitas representam valores individuais. Barras largas representam as médias dos valores de cada grupo, com os respectivos erros-padrões das médias.

4. Berman M L, Lowe H J, Bochantin J and Hagler K — Uptake and elimination of methoxyflurane as influenced by enzyme induction in the rat.

## DISCUSSÃO

A poluição ambiental vem apresentando incremento progressivo, devido à grande quantidade e variedade de substâncias potencialmente tóxicas, produzidas pela moderna sociedade industrial. Entre essas drogas os hidrocarbonatos desempenham um importante papel ecológico. Os anestésicos voláteis sendo hidrocarbonatos halogenados, e em particular o halotano (1-1-1-trifluór-2-bromoetano), têm sido apontados como agentes causadores de doenças ocupacionais advindas da poluição de ambientes cirúrgicos. A gravidade do risco a que estão sujeitos os indivíduos, expostos repetitivamente a concentrações sub-anestésicas dessas drogas, tem aumentado de tal maneira que a Sociedade Americana de Anestesiologistas designou recentemente uma comissão es-

pecial para estudar o problema. Os resultados deste estudo, publicados em 1974, vieram justificar plenamente a preocupação existente, corroborando as impressões preliminares de diversos autores. Cascorbi et al (17,18) haviam concluído que a transformação biológica do halotano é influenciada por fatores ambientais e que os indivíduos expostos cronicamente a seus vapores apresentam maior velocidade de metabolização da droga, em relação àquela exibida por indivíduos não expostos. Linde e Bruce (45) verificaram a presença de traços apreciáveis de gases e vapores anestésicos em salas cirúrgicas várias horas após cessar a administração dos mesmos, o que foi confirmado por Corbett (24) que encontrou traços de halotano até 64 horas decorridas do término da exposição. Além disso, determinações em amostras de ar expirado pelos próprios anestesiológicos demonstraram a presença de quantidades significativas do anestésico (23, 37, 71). Como repercussões tóxicas dessas exposições crônicas ao halotano salientam-se efeitos imunossupressores (13), taxas significativamente altas de aborto e disgenesias fetais em pacientes e em animais de experimentação (1,15,31,25,33); e hepatotoxicidade, incluindo hepatite e necrose centrilobular (8,11,12,15, 28, 40, 22, 61). No entanto os mecanismos intrínsecos desta citotoxicidade ainda não estão bem esclarecidos, conforme ressaltado por Holaday (39) e Van Dyke (68).

Dentre as alterações produzidas pela inalação repetitiva de halotano destacamos as hepáticas como objeto de nosso estudo, porque os mecanismos de detoxificação que ocorrem em certo grau em todos os tecidos, são mais intensos no fígado. Este órgão representa a sede mais ativa do metabolismo de drogas e se constitui no local preferencial das reações tóxicas eventualmente advindas da degradação biológica de diversos compostos xenobióticos e, em particular, do halotano (54). Os estudos de Brodie et al (6, 7) enfatizam que a duração e intensidade dos efeitos das substâncias exógenas dependem da velocidade com que agem os sistemas enzimáticos envolvidos em seu metabolismo e que, se não ocorresse degradação metabólica, as ações de alguns compostos perdurariam até durante meses. Diversos fatores como os de origem ambiental, nutricional, hormonal ou os devidos à própria administração de uma grande variedade de drogas, podem alterar a atividade dos sistemas metabólicos (22, 31, 34). A denominação *indução microsomal enzimática* refere-se essencialmente ao processo de estimulação da capacidade metabólica das enzimas localizadas nos microsomas hepáticos, a partir de alguns dos efeitos supra-citados.

Dois aspectos fundamentais relativos aos anestésicos voláteis e à indução microsomal devem ser considerados: de um



lado, o efeito de administração prévia de outras drogas sobre a degradação dos anestésicos e, de outro, a repercussão intrínseca da própria exposição crônica dos anestésicos sobre o sistema microsomal. Neste estudo objetivou-se a exploração de aspectos relacionados com a segunda eventualidade, pois, revendo a literatura pertinente, observamos que a maioria dos estudos experimentais tem focado, preferencialmente, as repercussões de administração dos agentes sobre o fígado de animais previamente submetidos a outras substâncias com capacidade de indução microsomal, particularmente o fenobarbital. Na realidade, poucos são os trabalhos que abordam os aspectos relacionados com a exposição repetitiva, principalmente no que se refere às concentrações sub-anestésicas dos agentes. Van Dyke (67) demonstrou que o tratamento prévio com fenobarbital acelera o metabolismo do metoxifluorano (2-2-dicloro-fluor-etil-metil-éter) e do halotano. Leeson e al (43) e Berman (2) verificaram uma produção aumentada de metabolitos derivados do metoxifluorano, principalmente o ácido oxálico, em ratos previamente tratados com fenobarbital. Assim, o uso daquele agente anestésico em pacientes que utilizam barbituratos deve ser potencialmente perigoso, mesmo quando empregado em baixas dosagens (10), pois há evidências de que a nefrotoxicidade associada à anestesia com metoxifluorano está correlacionada às taxas metabólicas e aos níveis de fluoreto de ácido oxálico advindos da degradação biológica do anestésico (49). Quanto ao aspecto de exposições iterativas produzirem indução microsomal, Berman e Bochantin (3) tiveram a primazia de comprovar que pequenas doses de metoxifluorano produzem, por si só, indução enzimática. Posteriormente, Linde e Berman (44) ampliaram estes experimentos, demonstrando que todos os anestésicos inalatórios, exceto os gases ciclopropano e óxido nítrico, estimulariam o metabolismo de drogas, sendo os éteres os mais potentes sob este aspecto. Segundo Brown e Sagalyn (11), a estimulação do sistema enzimático microsomal nessas condições seria resultado de uma indução semelhante à que ocorre em associação com o fenobarbital.

Os resultados do presente trabalho permitiram a verificação de um aumento estatisticamente significativo no consumo "in vitro" da droga (barbiturato) utilizada como indicadora do metaboblismo hepático, pelos animais submetidos à inalação repetitiva de halotano, em relação àqueles do grupo controle. Acreditamos poder atribuir este efeito ao fato de ter ocorrido indução microsomal hepática, desde que o consumo de barbiturato por homogeneizados de fígado é um teste empregado para verificação de tal fenômeno (22, 31, 35). Nossos resultados são concordes com os apresentados por

Ross e Cardell (59), que observaram indução microsomal em fígado de ratos submetidos a uma exposição diária de 7 horas de halotano durante 7 dias consecutivos. As observações iniciais sobre indução enzimática microsomal parecem datar de 1954, com os trabalhos de Brown e col. sobre a influência da dieta no metabolismo de amino-azo-corantes depois da descrição preliminar por Mueller (50,51) do metabolismo de compostos exógenos ocorrer através dos microsomas hepáticas. Desde esta época, têm sido realizados estudos para avaliar as possíveis implicações clínicas deste lado, visando à inibição de certos efeitos tóxicos de drogas ou à diminuição de alterações patológicas pregressas. Constituem exemplos dessa orientação a administração de fenobarbital, para diminuir os níveis de bilirrubinemia, a pacientes com colestase intra-hepática crônica (19, 58, 65), e a recém-nascidos com icterícia (26, 27, 29, 72). Acredita-se também que a administração prolongada de difenil-hidantoína produz aceleração do metabolismo de glicocorticóides, resultando em melhora importante no quadro clínico de pacientes portadores de Síndrome de Cushing, conforme relato de Werk et al (69, 70).

Se estes aspectos abordados parecem reforçar o conceito de que a indução microsomal deva se revestir de um efeito peculiar ocasionando detoxificação orgânica, outras evidências emprestam-lhe outro tipo de significado. Assim, quando se trata da inalação crônica de agentes anestésicos, especialmente de hidrocarbonetos halogenados como o halotano, objeto de nosso estudo, estes mecanismos, levando a uma degradação biológica acelerada dos compostos, têm sido implicados como possíveis condicionadores de citotoxicidade, eventualmente verificada em associação a tais drogas (20, 52, 66, 67). Um exemplo ilustrativo dessa possibilidade refere-se ao flurexeno, outro anestésico volátil, o qual ainda não foi introduzido em nosso meio clínico. Reynolds e Maslem (57) relatam o caso de um paciente que recebia grandes doses de fenobarbital e difenil hidantoína, e apresentou necrose hepática maciça e morte após a anestesia com o flurexeno. Estes achados foram posteriormente confirmados experimentalmente por Harrison e Smith (38), que verificaram necrose hepática fulminante em ratos anestesiados com o flurexeno e que haviam recebido previamente fenobarbital.

Em decorrência do que foi discutido podemos afirmar que o grupo de animais submetido à inalação repetitiva de halotano apresentou um consumo hepático de barbiturato, "in vitro", aumentado em relação ao grupo controle, sendo a diferença estatística entre as médias de consumo dos grupos altamente significativa.

Essa diferença de consumo de barbiturato "in vitro" é atribuída a atividade metabólica mais elevada e, conseqüentemente, é compatível com a ocorrência do processo de indução enzimática microsomal por ação do halotano administrado em concentração sub-anestésica.

### SUMMARY

#### THE EFFECTS OF HALOTHANE ON THE RATS LIVER. MICROSOMAL ENZYMATIC INDUCTION

A study group of ten rats was submitted to a repetitive exposure to subanesthetic doses of halothane, for 2 hours a day during 7 days. A control group was exposed to 100% oxygen during the same periods.

Alteration in hepatic function were observed experimentally by the in vitro consumption of barbiturates by the homogenised rat liver, showing that there was a microsomal enzyme induction phenomenon. The results are discussed in relation to the possible effects of operating room pollution, by residual anesthetics.

### REFERÊNCIAS

1. Basford A and Fink B R — Teratogenic activity of halothane rats. *Anesthesiology*, 29:1167, 1968.
2. Belfrage S, Ahlgren I and Axelson S — Halothane hepatitis in an anesthetist. *Lancet*, II: 1466, 1966.
3. Berman M L and Bochantin J F — Nonspecific stimulation of drug metabolism in rats by methoxyflurane. *Anesthesiology*, 32:500, 1970.
4. Berman M L, Lowe, H J, Bochantin J and Hagler K — Uptake and Elimination of Methoxyflurane as Influenced by Enzyme Induction in the rat.
5. Blake D A, Barry J Q and Cascorbi H F — Qualitative analysis of halothane metabolites in man.
6. Brodie B B, Axlrod J, Cooper J R, Gaudette L, La Du B N, Mitoma C and Udenfriend S — Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 121:603, 1955.
7. Brodie B B, Cosmides G J and Rall D P — Toxicology and the biomedical sciences. *Science*, 148:1547, 1965.
8. Brody G L and Sweet R B — Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis. *Anesthesiology*, 24:29, 1963.
9. Brown R R, Miller J A and Miller E C — The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. *J Biol Chem* 209:211, 1954.
10. Brown Jr B R — Hepatic microsomal enzyme induction. *Anesthesiology*, 39: 178, 1973.
11. Brown Jr B R and Sagalyn A M — Hepatic microsomal enzyme induction by inhalation anesthetics: mechanism in the rat. *Anesthesiology*, 40:152, 1974a.
12. Brown Jr B R, Sipes G I and Sagalyn A M — Mechanisms of acute hepatic toxicity. *Anesthesiology*, 41:554, 1974b.
13. Bruce D L and Wingard D W — Anesthesia and the immune response. *Anesthesiology*, 34:271, 1971.
14. Bruce D L and Berman M L — A device for monitoring small animal activity in anesthesia research. *Anesth Analg C R* 51:464, 1972.
15. Brunker J P and Blumenfeld C M — Liver necrosis after halothane anesthesia: cause or coincidence? *New Eng J Med* 268:531, 1963.

16. Bussard D A, Stoelting R K, Peterson C and Ishay M — Fetal changes in hamsters anesthetized with nitrous oxide and halothane. *Anesthesiology*, 41: 275, 1974.
17. Cascorbi H F, Blacke D A and Helrich M — Differences in the biotransformation of halothane in man. *Anesthesiology*, 32:119, 1970.
18. Cascorbi H F, Blake D A and Helrich M — Halothane biotransformation in mice and man. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*, Ed B R Fink, Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp 197, 1972.
19. Catz C and Yaffe S J — Pharmacological modification of bilirubin conjugation in the newborn. *Amer J Dis Child* 104:516, 1962.
20. Cohen E N and Hood N — Application of low temperature autoradiography to studies of the uptake and metabolism of volatile anesthetics in the mouse: III. Halothane. *Anesthesiology*, 31:553, 1969.
21. Cohen E N, Belville J W and Brown B W — Anesthesia, pregnancy, and miscarriage: A study of operating room nurses and anesthesiologists. *Anesthesiology*, 35:343, 1971.
22. Conney A H — Pharmacological implication of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev* 19:317, 1967.
23. Corbett T H and Ball G L — Chronic exposure to methoxyflurane: a possible occupational hazard to anesthesiologists. *Anesthesiology*, 34:532, 1971.
24. Corbett T H — Retention of Anesthetic agents following occupational exposure. *Anaesth Analg C R* 52:614, 1973.
25. Corbett T H, Cornell R G, Endres J L and Lieding K — Birth defects among children of nurse-anesthetists. *Anesthesiology*, 41:321, 1974.
26. Crigler J F Jr and Gold N I — Sodium phenobarbital — induced decrease in serum bilirubin in an infant with congenital nonhemolytic jaundice and kernicterus. *J Clin Invest* 45:998, 1966.
27. Crigler J F Jr and Gold N I — Effect of sodium phenobarbital on bilirubin metabolism in an infant with congenital, nonhemolytic, unconjugated hyperbilirubinemia and kernicterus. *J Clin Invest* 48:42, 1969.
28. Defalque R J and Stoelting V K — Hepatic failure after halothane. *Anesthesiology*, 25:868, 1964.
29. De Leon A, Gartner L M and Arias I M — The effect of phenobarbital on hyperbilirubinemia in glucuronyl transferase deficient rats.
30. Fink B R (Ed) — *Toxicity of Anesthetics*. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1969.
31. 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.
32. Garfinkel D — Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77: 493, 1958.
33. Geretto P — Ação teratogênica do fluotano no rato. *Rev Bras Anest* 23:17, 1973.
34. Gillette J R — Metabolism of drugs and foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Progr Drug Res* 6:13, 1963.
35. Gillette J R — Techniques for studying drug metabolism in vitro. In *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. Ed B N La Du, H G Mandel, E L Way, Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp 400, 1972.
36. Goldbaum L R — Analytical determination of barbiturates. *Anal Chem* 24: 1604, 1952.
37. Hallen B, Ehrner-Samuel H and Thomason M — Measurements of halothane in the atmosphere of an operating theatre and in expired air and blood of personnel during routine anesthetic work. *Acta Anaesthesiol Scand* 14:17, 1970.
38. Harrison G G and Smith J S — Massive lethal hepatic necrosis in rats anesthetized with fluorexene after microsomal enzyme induction. *Anesthesiology*, 39:619, 1973.

39. Holaday D A — Metabolic production of toxic substances following general anesthesia. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*, Ed B R Fink, Williams & Wilkns Co, Baltimore, pp 215, 1972.
40. Klatskin G and Kimberg D V — Recurrent hepatitis attributable to halothane sensitization in an anestheis. *N Engl J Med* 280:515, 1968.
41. Klingenberg M — Pigmens of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376, 1958.
42. Kiriluk L B — Halothane and liver necrosis. *Am Surgeon* 37:482, 1971.
43. Leeson S, Colella J J and Brown B R Jr — The effect of phenobarbitone on the metabolism of methoxyflurane to oxalic Acid in the Rat. *Br J Anaesth* 44:1224, 1972.
44. Linde H W and Berman M L — Non specific stimulation of drug metabolizing enzymes by inhalation anesthetic agents. *Anesth C R* 50:656, 1971.
45. Linde H W and Bruce D L — Halothane content in recovery room air. *Anesthesiology*, 36:517, 1972.
46. Mannering G J — Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. In *Fundamentals of Drugs Metabolism and Drug Disposition*, B N La Du, H G Mandel, E L Way Eds. The Williams & Wilkins Col, Baltimore, 1971.
47. Mason H S — Mechanisms of oxygen metabolism. *Adv Enzymol* 19:79, 1957.
48. 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.
49. Mazze R I, Truddell J R and Cousin M J — Methoxyflurane metabolism and renal dysfunction: clinical correlation in man. *Anesthesiology*, 35:247, 1971.
50. Mueller G C and Miller J A — The reductive cleave of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement of triphosphopyridine nucleotide.
51. Mueller G C and Miller J A — The metabolism of methylated aminoazo dyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenstes. *J Biol Chem* 202:579, 1953.
52. Omura T and Sato, R — The carbon monoxide — binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239:2370, 1964.
53. Powell J F — Trichlorethilene absorption elimination and metabolites. *Brit J Int Med* 2:142, 1945.
54. Rehder K and Forbes J — Halothane biotransformation in man: a quantitative study. *Anesthesiology*, 28:711, 1967.
55. Remmer H — Drug as activators of drug enzymes. *Proc 1st Inter Pharmacol Stockholm*, vol 6, pp 235, Mc Millan, New York, 1962 (In La Du, Ed, *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. The Williams & Wilkins Col, Baltimore, 1972).
56. Remmer H and Siegert M — Beschleunigter Arzneimittlebbau durch enzyminduktion beim Hunde nach behandlung mit phenobarbital. *Arch Exp Pathol Pharmakol* 247:522, 1964.
57. Reynolds E S and Moslen M T — Liver injury following halothane anesthesai in phenobarbital pretreated rats. *Biochem Pharmacol* 23:189, 1972.
58. Roberts R J and Plaa G L — Efect of phenobarbital on the excretion of an exogenous bilirubin load. *Biochem Pharmacol* 16:827, 1967.
59. Ross W T Jr and Cardell R R Jr — Effects of halothane on the ultrastructure of rat liver cells. *Am J Anat* 135:5, 1972.
60. Roth J S and Bukovsky J — Studies on an N-demethylating system in rat liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 131:275, 1961.
61. Sharpstone P, D R and Williams R — Halothane hepatitis — a preventable disease? *Brit Med J* 1:448, 1971.
62. Smuckler E A — The pathology of halogenated hidrccarbons and halothane: a Brief review and speculation. In *Cellular Biology and Toxicity of Anesthetics*, Ed B R Rink. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp 221, 1972.

63. Snedcor G W and Cockran W C — Statistical Methods, Iowa State, 3rd ed, 1969.
64. Sunshine I — Barbiturates. In Standard Methods of Clinical Chemistry, Vol 3. Academic Press, New York and London, 1961.
65. Thompson R P H and Williams R — Treatment of chronic intrahepatic cholestasis with phenobarbitone. *Lancet*, 2:646, 1967.
66. Van Dyke R A, Chenoweth M B and Van Poznak A — Metabolism of volatile anaesthetics. I. Conversion in vivo of several anaesthetics to  $C_{14}O_2$  and chloride. *Biochem Pharmacol* 13:1239, 1964.
67. Van Dyke R A and Chenoweth M B — The Metabolism of volatile anaesthetics. II. In vitro metabolism of methoxyflurane and halothane in rat liver slices and cell fractions. *Biochem Pharmacol* 14:603, 1965.
68. Van Dyke R A — Biotransformation of volatile anesthetics with special emphasis on Role of Metabolism in Toxicity of Anesthetics. *Canad Anaesth Soc J* 20:21, 1973.
69. Werk E E Jr, Mac Gee J and Sholiton L J — Effect of diphehylhydantoin on cortisol metabolism in ma *J Clin Invest* 43:1824, 1964.
70. Werk E E Jr, Sholiton L J and Olinger C P — Amelioration of nontumorous Cushing's syndrome by diphenylhydantoin. *Excerpta Medica Foundation*, p 301, New York, 1966.
71. Whitcher C E, Cohen E N and Trudell J R — Chronic exposure to anesthetic gases in the operating room. *Anesthesiology*, 35:348, 1971.
72. Yafee S J, Levy G, Matsuzaw, T and Baliah T — Enhancement of glucoronide conjugating capacity in a hyperbilirrubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. *New Eng J Med* 275:1961, 1966.