

## Efeitos de Subdoses de Halotano e Óxido Nitroso em Ratos\*

Luiz Antonio Vane<sup>1</sup>; Yara Marcondes Machado Castiglia<sup>2</sup>; Maria Delgi Ramos<sup>3</sup>; Carlos Eduardo Bacchi<sup>4</sup>; Tsieko Gushiken<sup>5</sup>; Lourenço Rubio Mira<sup>6</sup>; Paulo Roberto Curi<sup>7</sup>

### SUMMARY

Vane, LA, Castiglia YMM, Ramos MD, Bacchi CE, Gushiken T, Mira LR, Curi PR - Effects of Subdoses of Halothane and Nitrous Oxide in Rats

*Background and Objectives* - Chronic inhalation of anesthetic agents, due to their residual and additive effects, can produce deleterious changes in different organs and systems. The purpose of this experimental study was to evaluate some organic alterations in animals exposed to the chronic inhalation of halothane and nitrous oxide.

*Methods* - The effects of subdoses of inhalational anesthetics were evaluated in 80 rats, 40 male and 40 female, allocated into 4 groups of 20 animals. Group 1: animals breathing room air; Group 2: halothane 50 ppm; Group 3: nitrous oxide 400 ppm; Group 4: halothane 50 ppm and nitrous oxide 400 ppm. The animals were exposed to the experimental conditions 6 hours per day, for 180 days. The following parameters were observed: blood cells (segmented leukocytes, lymphocytes, eosinophils, monocytes); electrolytes (sodium, potassium, calcium); glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminases, prolactine, stradiol, creatinine and glycemia; weight gain; histopathologic changes in different organs (brain, heart, liver, kidney, testicle, aorta, stomach, bone marrow).

*Results* - The histopathologic study showed normal organs in all groups. Stradiol and prolactine levels were below the limit of detection of the method. Transaminases were significantly reduced. In Groups 2 and 3 there was a reduction in the levels of sodium, calcium, glucose, creatinine and of weight gain; in Group 3 the percentage of eosinophils were also reduced. In Group 4, the reduction in the same parameters were greater with the additional reduction of potassium levels and segmented leukocytes; the percentage of lymphocytes and eosinophils increased and the monocytes remained unchanged.

*Conclusions* - Under the experimental conditions, the simultaneous chronic inhalation of halothane and nitrous oxide induced greater changes as compared to the inhalation of each individual agent. Despite alterations in biochemical data, blood cells and weight gain, no histopathological abnormality was observed.

**KEY-WORDS** - ANESTHETIC, Gaseous: nitrous oxide; Volatile: halothane; COMPLICATIONS: contamination, pollution

\*Trabalho realizado no Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP e financiado pela FAPESP. Laureado com o Prêmio AGA/SBA -1994

1 Prof Titular do Depto de Anestesiologia da UNESP

2 Prof Adjunto Livre Docente do Depto de Anestesiologia da UNESP

3 Prof Assistente Doutor do Depto de Ginecologia e Obstetrícia da UNESP

4 Prof Assistente Doutor do Depto de Patologia da UNESP

5 Bióloga da Divisão de Hemocentro do Hospital de Clínicas da UNESP

6 Biólogo Chefe do Laboratório Clínico do Hospital de Clínicas da UNESP

7 Prof Titular do Depto de Estatística da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

Correspondência para Luiz Antonio Vane  
Rua Capitão Tito 247  
18603-320 Botucatu - SP

Apresentado em 10 de setembro de 1994

Aceito para publicação em 23 de novembro de 1994

© 1995, Sociedade Brasileira de Anestesiologia

**A**inda não eram decorridos três anos da primeira demonstração de anestesia cirúrgica, quando John Snow estabeleceu a correlação entre a concentração dos agentes anestésicos no ar inspirado e seus efeitos farmacológicos<sup>1</sup>.

Está implícito em todas as profissões um risco que é inerente às suas naturezas e ao meio onde elas se desenvolvem.

O ambiente insalubre dos hospitais, e principalmente das salas cirúrgicas, ocasiona alterações orgânicas em anestesiológicos, cirurgiões e pessoal de enfermagem, dando origem as chamadas Enfermidades Profissionais específicas dessa área.

O conhecimento de que os agentes

anestésicos, inalados em dose conhecida, denominada dose anestésica, produzem efeitos determinados nos pacientes permite que se compreenda porque estes são capazes de adquirir enfermidades posteriores pelo efeito dos mesmos agentes anestésicos, principalmente se administrados em anestésias repetidas.

Contudo, o paciente recebe anestesia em dose terapêutica e por curto período de tempo, enquanto que o anestesiológico, embora receba menor concentração de agente anestésico, esta exposto a longas jornadas diárias, inalando drogas que, pelo efeito residual e aditivo, produzem alterações em seu organismo, com conseqüências nocivas a sua saúde - aparecimento de manifestações gastrointestinais, cutâneas, hematopoiéticas e pulmonares<sup>2-7</sup>. Essas drogas produzem ainda depressão da medula óssea com leucopenia<sup>8-13</sup>, inibição da síntese de metionina<sup>7</sup>, lesão hepática<sup>14</sup>, alteração da agregação plaquetária<sup>15</sup>, aumento da incidência de tumores malignos<sup>16-20</sup> e imunodepressão<sup>21</sup>.

A ação dos poluentes de sala cirúrgica sobre o sistema nervoso central ocasiona sintomas como cefaléia, fadiga, redução das acuidades visual, auditiva e olfatória, inapetência, irritabilidade, náusea, sonolência e alteração da memória<sup>3,5,22-33</sup>, determinando sérios prejuízos na atuação dos profissionais da sujeitos a mesma<sup>4,18,26,34-44</sup>.

Para as profissionais do sexo feminino, acrescenta-se ainda maior índice de abortamentos, infertilidade e teratogênese<sup>16,20,45-48</sup>.

Na verdade, a inalação crônica de drogas pelos anestesiológicos não é pequena, chegando a ser percebida por seus familiares, pelo odor característico, principalmente depois de exposições mais prolongadas.

Por todos esses motivos, em países mais desenvolvidos foram implantados sistemas de proteção e estabelecidas legislações no sentido de se reduzirem ao máximo os perigos a que se expõe o pessoal de sala cirúrgica<sup>49</sup>.

Este trabalho teve por objetivo o estudo dos efeitos de subdoses de anestésicos gerais

inalatórios sobre alguns elementos figurados do sangue, os eletrólitos, as transaminases glutâmico-oxalacética e glutâmico pirúrica, a prolactina, o estradiol, a creatinina, a glicemia e sobre diversos órgãos e estruturas de ratos, expostos diariamente a essas drogas, por período de tempo prolongado, ou seja, durante 180 dias.

## MÉTODOS

### Condições Experimentais

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com concentrações de halotano a 50 ppm e/ou óxido nítrico a 400 ppm, que são correspondentes aos níveis normalmente encontrados em salas de cirurgia. Esses níveis foram controlados por cromatografia gasosa.

As caixas plásticas onde foram mantidos os animais para inalação apresentavam um volume de ar proporcional ao volume de ar de uma sala cirúrgica. Foi tornado como padrão de tamanho de sala cirúrgica aquele da maioria das salas do Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da FMB. Levou-se em consideração um número médio de 10 participantes de um ato anestésico-cirúrgico e o volume minuto médio respirado por essa equipe. Assim, a relação entre o volume minuto médio respirado pelos animais e o volume de ar da caixa plástica foi igual à relação entre o volume minuto médio de ar respirado pela equipe anestésico-cirúrgica e o volume de ar total da sala cirúrgica.

Tentou-se, desse modo, reproduzir com fidelidade a quantidade de anestésico que deveria ser absorvida pelos animais a fim de que houvesse semelhança com o que acontece com a equipe médica, mantendo-se nas caixas os mesmos níveis de poluição que se encontram normalmente na sala cirúrgica.

### Animais Utilizados

Foram utilizados 80 animais adultos, sendo 40 fêmeas e 40 machos, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu - UNESP.

### Grupos Experimentais

Foram criados 4 grupos experimentais com 20 animais em cada grupo, sendo 10 machos e 10 fêmeas:

- Grupo 1 (G1) - Grupo controle - animais respirando ar ambiente (sem anestésico);
- Grupo 2 (G2) - animais respirando ar ambiente com halotano a 50 ppm;
- Grupo 3 (G3) - animais respirando ar ambiente com óxido nitroso a 400 ppm
- Grupo 4 (G4) - animais respirando ar ambiente com halotano a 50 ppm e óxido nitroso a 400 ppm.

### Seqüência Experimental e Técnicas

Os animais foram pesados e expostos diariamente à poluição anestésica conforme o grupo ao qual pertenciam, não tendo havido privação de alimentos e água, mesmo durante o período de exposição a poluição.

A caixa de inalação foi dividida ao meio por uma tela fina, onde foram separados os machos das fêmeas. A caixa foi recoberta por uma lâmina de vidro que permitia a observação dos animais.

A fonte poluidora de halotano foi obtida através de um vaporizador calibrado para esse anestésico, marca K. Takaoka, modelo 1200, com fluxo de ar comprimido de 2 litros por minuto. A aferição do vaporizador foi realizada com auxílio de refratômetro portátil da Riken - *Anaesthesia Application*. Óxido nitroso foi introduzido na caixa através de dispositivo em Y no circuito entre o vaporizador e a caixa de inalação.

As medidas das concentrações dos anestésicos foram controladas por cromatogra-

fia gasosa, através de injeção direta no cromatógrafo (cromatógrafo a gás modelo CG 37-023 da Instrumentos Científicos CG Ltda) de amostra de 2 microlitros de ar obtida do interior da caixa, por meio de agulha 20 x 8 instalada na lateral da mesma.

A primeira hora de contaminação da caixa com os anestésicos foi para estabilização das condições experimentais. A seguir, os animais foram introduzidos na caixa de inalação e lá permaneceram por 6 horas/dia, durante período de 180 dias.

Findo esse período, os animais foram anestesiados com inalação de éter e sacrificados por aspiração de sangue miocárdico. O sangue foi destinado às diversas dosagens e do animal foram retirados órgãos e estruturas para exame histopatológico.

### Atributos Estudados

Foram estudados os seguintes atributos:

#### Sangüíneos:

- Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO)
- Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)
- Creatinina
- Eletrolítos (sódio, potássio, cálcio)
- Glicemia
- Estradiol (E-2)
- Prolactina
- Porcentagem de segmentados
- Porcentagem de linfócitos
- Porcentagem de eosinófilos
- Porcentagem de monócitos

#### Peso Corpóreo

#### Estudo Histopatológico:

- Cérebro
- Coração
- Fígado
- Rim
- Ovário
- Testículo
- Aorta
- Estômago
- Medula Ossea

### Método Estatístico

Para cada uma das variáveis foi efetuada a Análise de Variância para fatorial inteiramente aleatorizado 50 com os testes de: interação entre os 2 fatores, efeito de N<sub>2</sub>O e efeito de halotano.

As estatísticas F calculadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Quando  $0,05 < p < 0,10$  foi referida tendência a significância.

Para eosinófilo e monócito foi utilizado o correspondente método não paramétrico com o cálculo da estatística H, com distribuição  $\chi^2$ .

### RESULTADO:

Os resultados referentes ao estudo histopatológico dos diversos órgãos e estruturas dos animais dos grupos submetidos a poluição anestésica não diferiram daqueles do grupo controle (G1). Além disso foi constatada normalidade em todos os grupos pesquisados.

Não foi possível realizar a leitura dos níveis plasmáticos de estradiol e prolactina uma vez que as dosagens obtidas em pg/ml (estradiol) e ng/ml (prolactina) foram muito baixas. Essas dosagens não têm correspondência na curva apresentada no kit utilizado na metodologia.

Os demais resultados encontram-se nas figuras 1 a 12.

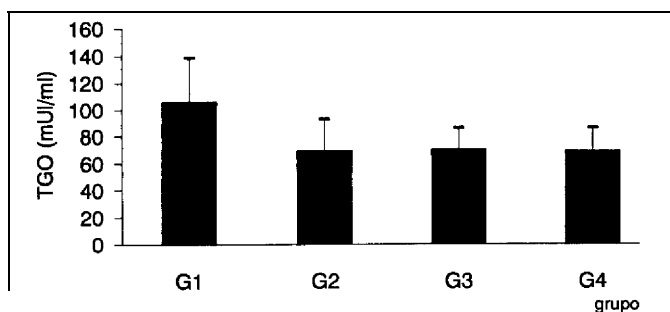


Fig 1 - TGO (mUI/ml). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre N<sub>2</sub>O e halotano ( $F = 6,04$ ;  $p < 0,05$ ) - existe interação significativa entre N<sub>2</sub>O e halotano

Hipótese 4: Efeito do N<sub>2</sub>O ( $dms = 20,94$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 = G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano ( $dms = 20,94$ ) - sem N<sub>2</sub>O:  $G1 > G2$ ; com N<sub>2</sub>O:  $G3 = G4$

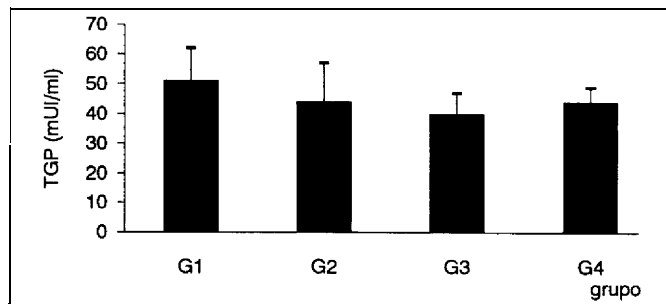


Fig 2- TGO (mUI/ml), Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre N<sub>2</sub>O e halotano ( $F = 3,34$ ;  $0,05 > p > 0,10$ ) - existe tendência à interação entre N<sub>2</sub>O e halotano

Hipótese 2: Efeito de N<sub>2</sub>O ( $F = 3,46$ ;  $0,05 > p > 0,10$ ) - a adição de N<sub>2</sub>O pode diminuir ou não a TGP

Hipótese 3: Efeito do halotano ( $F = 0,15$ ; NS) - a adição de halotano não altera a TGP

Hipótese 4: Efeito do N<sub>2</sub>O ( $dms = 8,42$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do halotano ( $dms = 8,42$ ) - sem N<sub>2</sub>O:  $G1 = G2$ ; com N<sub>2</sub>O:  $G3 = G4$

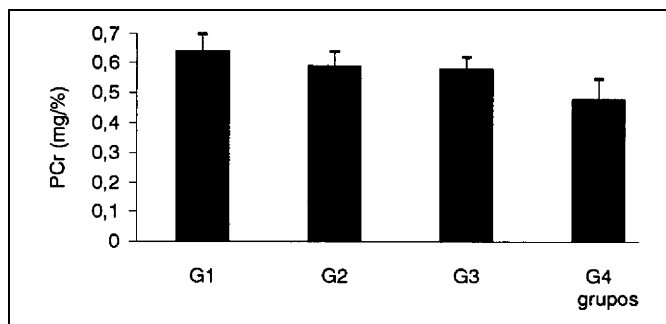


Fig 3- Creatinina plasmática (mg/dl). média dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre N<sub>2</sub>O ( $F = 1,6$ ; NS) - não há interação

Hipótese 2: Efeito de N<sub>2</sub>O ( $F = 22,75$ ;  $p < 0,01$ ) - a adição de N<sub>2</sub>O diminui a creatinina plasmática

Hipótese 3: Efeito de halotano ( $F = 17,12$ ;  $p < 0,01$ ) - a adição de halotano diminui a creatinina plasmática

Hipótese 4: Efeito do N<sub>2</sub>O ( $dms = 0,049$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do halotano ( $dms = 0,049$ ) - sem N<sub>2</sub>O:  $G1 > G2$ ; com N<sub>2</sub>O:  $G3 > G4$

### D SCUSSÃO

A contaminação ambiental que incide sobre os organismos produz mutações somáticas e, com o tempo, pode causar danos irreversíveis à espécie<sup>51,52</sup>. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar a relação existente entre a transformação dessas doses subanestésicas que poluem nossos ambientes cirúrgicos e a saúde dos profissionais

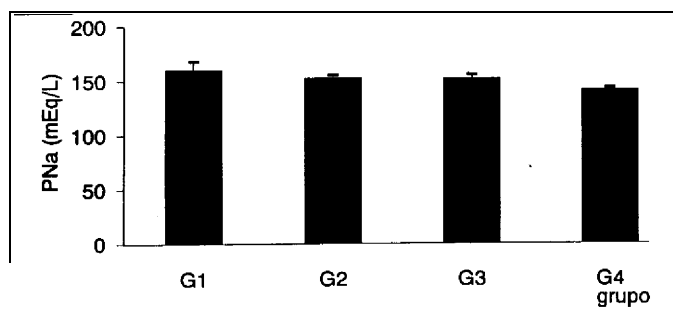


Fig 4- Sódio plasmático (mEq/L). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F=0,5$ ; NS) não há interação entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 2: Efeito de  $N_2O$  ( $F=38,75$ ;  $p<0,001$ ) - a adição de  $N_2O$  diminui o sódio plasmático

Hipótese 3: Efeito do halotano ( $F=31,18$ ;  $p<0,001$ ) - a adição de halotano diminui o sódio plasmático

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms=4,39$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do halotano ( $dms=4,39$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 > G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 > G4$

que aí trabalham<sup>53</sup>.

Entretanto, o problema da contaminação ambiental não pode ser imputado somente às salas cirúrgicas porque as salas de recuperação, ainda que em menor quantidade, também são locais poluídos. As concentrações de gases anestésicos contaminantes medidas nas salas de operação podem variar desde pequenas quantidades, até vários centos de parte por milhão, existindo diferenças dentro de um mesmo local<sup>53</sup>.

Existe informação que em salas cirúrgicas com mecanismos deficitários de ventilação (a maior parte de nossas salas) os níveis de

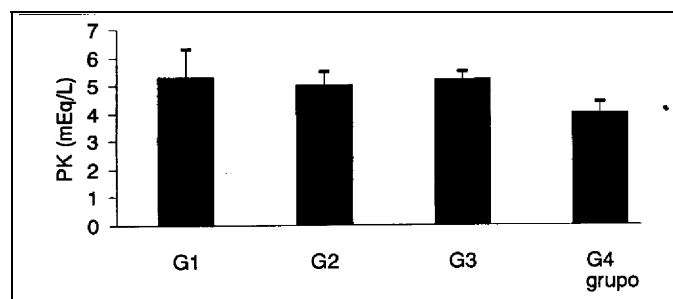


Fig 5- Potássio plasmático (mEq/L). Média dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 6,09$ ;  $p<0,05$ ) - existe interação significativa entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 0,55$ ) - sem halotano:  $G1 = G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano ( $dms = 0,55$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 = G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 > G4$

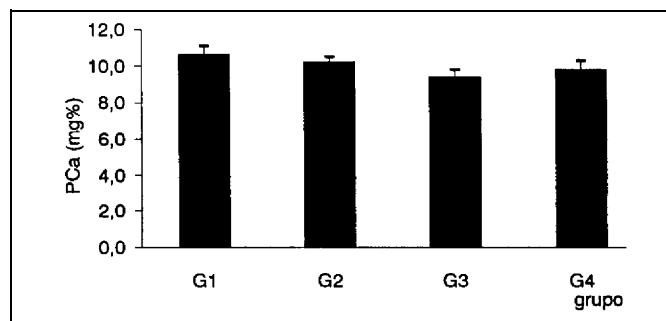


Fig 6- Cálcio plasmático (mg%). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 10,45$ ;  $p<0,01$ ) - existe interação significativa entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 0,37$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano ( $dms = 0,37$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 > G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 = G4$

halotano podem atingir de 85 a 300 ppm<sup>55</sup>. Outros autores relataram concentrações de halotano em sala cirúrgica de 40 ppm e, de 428 ppm, a de óxido nitroso<sup>56</sup>. Já encontraram até 85 ppm de halotano e 7.000 ppm de óxido nitroso, quando da utilização de sistemas sem reinalação<sup>57</sup>.

Em nosso trabalho, procuramos repetir essas situações observadas no dia a dia, utilizando halotano, 50 ppm, e óxido nitroso, 400 ppm, e encontramos significativas alterações sanguíneas para o lado dos eletrólitos (tabelas 7 a 12, figuras 4 a 6). O sódio plasmático apresentou valores menores nos grupos poluídos

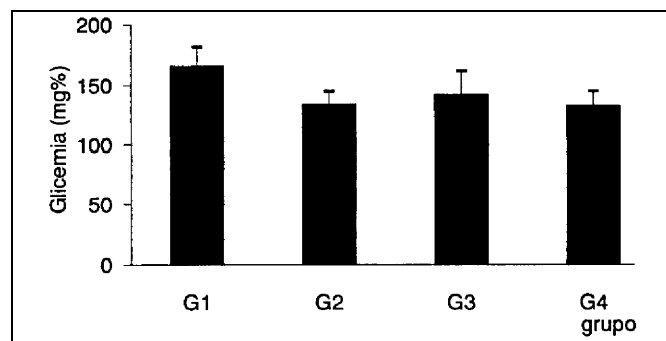


Fig 7- Glicemia (mg/dl). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 5,49$ ;  $p<0,05$ ) - existe interação significativa entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 13,66$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 = G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano ( $dms = 13,66$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 > G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 = G4$

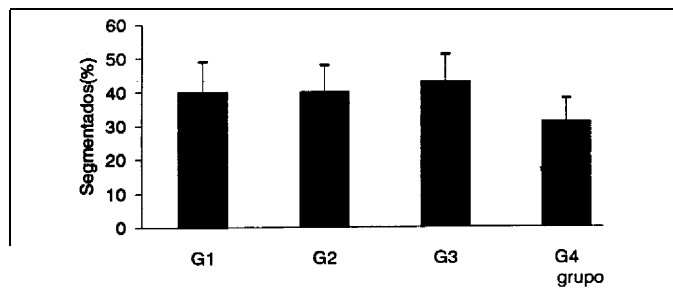


Fig 8- Segmentados (%). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 5,02$ ;  $p < 0,05$ ) - existe interação significativa entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 7,17$ ) - sem halotano:  $G1 = G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano ( $dms = 7,17$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 = G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 > G4$

tanto por halotano como por óxido nítrico. Entretanto, quando se utilizaram ambos os agentes inalatórios, esses valores foram significativamente menores. Outro íon que também se alterou, diminuindo, com a associação dos dois anestésicos foi o potássio que, entretanto, não sofreu influência da poluição provocada pela inalação em separado dos dois agentes. O cálcio também diminuiu e, embora já seja significativa essa diminuição no grupo que inalou cronicamente o halotano, foi nos grupos G3 e

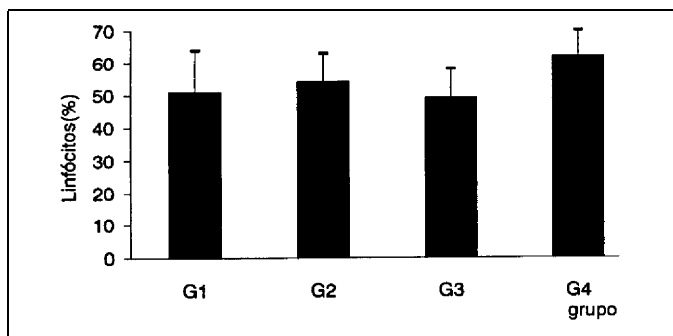


Fig 9- Linfócitos (%). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 2,66$ ; NS) não há interação entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 2: Efeito de  $N_2O$  ( $F = 0,91$ ; NS) - a adição de  $N_2O$  não influencia sobre os linfócitos

Hipótese 3: Efeito do halotano ( $F = 6,93$ ;  $p < 0,05$ ) - a adição de halotano aumentou a porcentagem de linfócitos

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 8,73$ ) - sem halotano:  $G1 = G3$ ; com halotano:  $G2 = G4$

Hipótese 5: Efeito do halotano ( $dms = 8,73$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 = G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 < G4$

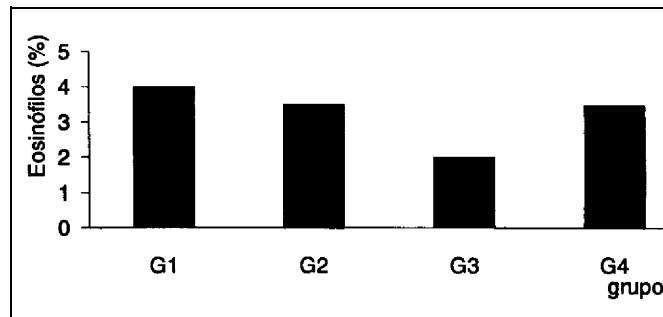


Fig 10- Eosinófilos (%). Mediana dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 1,48$ ; NS) não há interação entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 2: Efeito de  $N_2O$  ( $F = 3,57$ ;  $0,05 > p > 0,01$ ) - a adição de  $N_2O$  pode ou não diminuir a porcentagem de eosinófilos

Hipótese 3: Efeito do halotano ( $F = 0,43$ ; NS) - a adição de halotano não modifica a porcentagem de eosinófilos

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  ( $dms = 4,39$ ) - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do halotano ( $dms = 4,39$ ) - sem  $N_2O$ :  $G1 = G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 < G4$

G4, com óxido nítrico e este mais halotano, que o íon apresentou seus menores resultados.

Outra condição que agrava o efeito poluente é aquela na qual as quantidades de agentes voláteis que se metabolizam no organismo não são somente proporcionais à concentração inalada, mas também ao tempo de exposição<sup>58-60</sup>, o que obriga a se pensar no número de horas em que todos os dias o pessoal que trabalha dentro do centro cirúrgico passa exposto a esse tipo de intoxicação. Nossos animais fica-

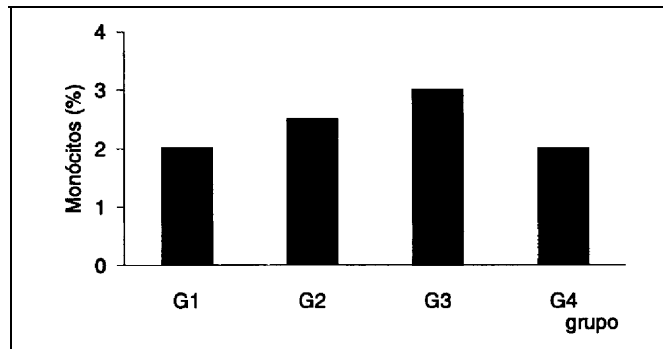


Fig 11 - Monócitos (%). Mediana dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 0,47$ ; NS) não há interação entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 2: Efeito de  $N_2O$  ( $F = 1,05$ ; NS) - a adição de  $N_2O$  não alterou a porcentagem de monócitos

Hipótese 3: Efeito do halotano ( $F = 0,04$ ; NS) - a adição de halotano não alterou a porcentagem de monócitos

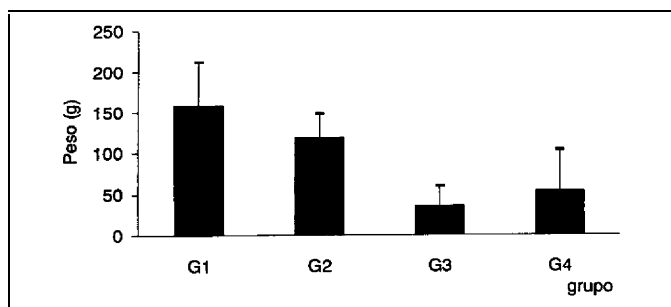


Fig 12- Ganho de peso (g). Média  $\pm$  DP dos valores observados nos quatro grupos experimentais

Hipótese 1: Interação entre  $N_2O$  e halotano ( $F = 10,11; p < 0,01$ ) - existe interação significativa entre  $N_2O$  e halotano

Hipótese 4: Efeito do  $N_2O$  - sem halotano:  $G1 > G3$ ; com halotano:  $G2 > G4$

Hipótese 5: Efeito do Halotano - sem  $N_2O$ :  $G1 > G2$ ; com  $N_2O$ :  $G3 = G4$

ram expostos ao halotano e óxido nitroso por 6 horas diárias durante 180 dias, no intuito de mimetizar essa situação.

Corbett & Ball advertem que o risco decorrente da inalação de doses não anestésicas de vapores de drogas anestésicas não reside somente na exposição aguda<sup>61</sup>. Comprovaram que a eliminação urinária de metabólitos do halotano pode-se prolongar e que isto deve ser considerado como prova de toxicidade acumulada após repetidas exposições aos agentes anestésicos.

São exatamente essas frações contaminantes da atmosfera das salas de cirurgia as biologicamente ativas e, em consequência, perigosas para a saúde do pessoal que as inala permanentemente.

O homem é a espécie que metaboliza o halotano em maior grau, alcançando cerca de 20 a 25% do inalado por dia<sup>62</sup>. Além disso, o metabolismo do halotano começa pouco tempo depois de a anestesia ser iniciada, porém a excreção de seus produtos finais, pela urina, perdura por pelo menos cinco dias, podendo atingir 14 dias<sup>63</sup>. Tem-se estabelecido que a quantidade de bromo obtida como metabólito do halotano pode ser medida da porção desse anestésico que se transforma. Paralelamente a esta desbromização, ocorre desclorinação,

originando um produto intermediário que é o ácido trifluoracético<sup>64</sup>. Essas transformações têm lugar predominantemente no fígado.

O halotano, cronicamente administrado, produz alterações sobre a respiração mitocondrial por inibição da  $NADH$ <sup>64</sup>. É interessante notar que, durante a quarta etapa da respiração, a perda do controle da respiração mitocondrial ocorre após a exposição ao agente e não durante a mesma. Durante a administração crônica de halotano há depressão do glucogênio hepático, efeito que dura de 3 a 4 semanas<sup>65</sup>, funcionando como um desacoplador da fosforilação oxidativa<sup>66,67</sup>.

Esses fatores vêm de encontro a nossos resultados com relação à glicemia. Observamos que os grupos em que utilizamos o halotano e óxido nitroso, separados ou em associação (G2, G3 e G4), apresentaram menores níveis glicêmicos que o controle (tabelas 13 e 14, figura 7).

Corroborando esses resultados glicêmicos, nossos ratos expostos à poluição crônica por halotano e óxido nitroso, separada e conjuntamente, deixaram de ganhar peso quando comparados com os ratos do grupo controle. Embora tivessem menor ganho quando respiravam ar poluído com halotano, o óxido nitroso, sozinho e associado ao halogenado (G3 e G4), interferiu muito mais no peso corpóreo dos animais, fazendo com que se visse o menor ganho de peso do experimento (Figura 12).

A creatinina plasmática, correlacionando-se com a massa muscular e, portanto, com o peso corpóreo, também mostrou diminuição em todos os grupos poluídos, porém mais intensa em G4, grupo no qual se utilizaram óxido nitroso e halotano.

Por outro lado, alguns autores indicam que compostos trifluorinados, como o halotano, podem ser considerados como determinantes antigênicos e atuam como haptenos, fazendo com que a exposição crônica ao halotano provoque uma hipersensibilidade com reação hiperalérgica, levando alguns anestesiológicos a desenvolverem hepatite aguda<sup>68-71</sup>.

Outros autores já relatavam alterações histológicas no fígado de animais expostos ao halotano por longo período<sup>72</sup>. Foi descrita uma infiltração gordurosa no fígado produzida por instilação gástrica de halotano<sup>73</sup>. Outro estudo chegou à conclusão de que a exposição crônica ao halotano leva a aumento na incidência de toxicidade hepática<sup>74</sup>, chegando alguns investigadores a considerar o desenvolvimento de hepatotoxicidade nesses indivíduos<sup>75</sup>. Ainda e de se levar em conta que a necrose maciça do fígado, embora rara, é muito mais freqüente em pacientes submetidos a múltiplas anestésias, enfatizando a importância da cronicidade a que os anestesiológicos estão expostos<sup>76</sup>.

Em nossos animais, o estudo histopatológico não demonstrou alteração, constatando normalidade estrutural. Quanto à pesquisa sanguínea de transaminases, os resultados mostram que o óxido nitroso diminuiu os níveis das transaminases glutâmico oxalacética e glutâmico pirúvica, enquanto que o halotano reduziu apenas os níveis da glutâmico oxalacética. Ou seja, em nossa pesquisa não se constatou alteração no hepatócito, para o lado da destruição celular, pelo menos que fosse detectada por análise de microscopia óptica ou pelos níveis de transaminases.

As alterações das provas de função hepática após administração de halotano são conhecidas desde a introdução deste halogenado na prática clínica<sup>77-79</sup>, tendo sido comprovadas posteriormente, tanto em animais de laboratório como em clínica, especialmente entre residentes de Anestesiologia<sup>80-82</sup>.

Já, a porcentagem de segmentados obtida nos ratos da presente pesquisa sofreu interferência da poluição ambiental com mistura de óxido nitroso e halotano. Houve diminuição significativa dessas células. Separadamente, nenhum dos dois agentes influenciou nas contagens. Os linfócitos aumentaram em porcentagem, significativamente, quando se associaram os dois agentes inalatórios. Os eosinófilos diminuíram quando se utilizou óxido nitroso. A poluição a que expusemos nossos ratos não alterou a por-

centam de monócitos.

Numerosos trabalhos enfocam o efeito dos anestésicos gasosos sobre o sangue e seus componentes. Foi comprovado experimentalmente que a exposição prolongada ao óxido nitroso, mesmo com tensões normais de oxigênio, é tóxica para a medula óssea<sup>2</sup> e, em consequência, há diminuição dos glóbulos brancos periféricos, tanto por diminuição de sua produção, quanto por destruição dos mesmos<sup>13,83</sup>.

O halotano exerce efeito evidente sobre as células granulocíticas da medula óssea, diminuindo o número de linfócitos<sup>37,84-86</sup>. Estes resultados têm sido reproduzidos com concentrações pequenas de halogenado (0,3%) após apenas 6 horas de administração<sup>86</sup>.

Segundo alguns autores, quase todas as técnicas de anestesia geral causam significativa deterioração da função fagocitária do sistema retículo endotelial<sup>87,88</sup>. Neste sentido, há relatos de que os linfócitos sofrem alterações funcionais pela exposição ao halotano que é, também, capaz de inibir a ativação dos linfócitos humanos cultivados<sup>21</sup>. Tais efeitos podem estar associados à redução do número dos linfócitos circulantes e dos produzidos pelo baço, já como consequência precoce da exposição ao halotano<sup>37,89,90</sup>.

## RESUMO

Vane LA, Castiglia YMM, Ramos MD, Bacchi CE, Gushiken T, Mira LR, Curi PR - Efeitos de Subdoses de Halotano e Óxido Nitroso em Ratos

*Justificativa e Objetivos - A inalação crônica de agentes anestésicos, pelo efeito residual e aditivo, produz alterações no organismo com consequências nocivas à saúde. O objetivo deste trabalho experimental foi estudar algumas alterações orgânicas em animais expostos à inalação crônica de halotano e óxido nitroso.*

*Método - Em 80 ratos (40 machos e 40 fêmeas) divididos em 4 grupos de 20 animais, foram estudados os efeitos de subdoses de anestésicos gerais inalatórios (Grupo 1- animais respirando ar ambiente; Grupo 2- halotano a 50 ppm; Grupo 3 -óxido nitroso a 400ppm; Grupo 4 - halotano a 50 ppm e óxido nitroso a 400 ppm),*



sobre elementos figurados do sangue (segmentados, linfócitos, eosinófilos, monócitos), os eletrólitos (sódio, potássio e cálcio), as transaminases glutâmico-oxalacética e glutâmico-pirúvica, a prolactina, o estradiol, a creatinina, a glicemia, o ganho de peso e sobre diversos órgãos e estruturas (estudo histopatológico) de animais expostos à poluição, 6 horas por dia por 180 dias. O estudo histopatológico foi realizado nos seguintes órgãos: cérebro, coração, fígado, rim, ovário, testículo, aorta, estômago e medula óssea.

**Resultados** - O estudo histopatológico constatou normalidade em todos os grupos. As dosagens de estradiol e prolactina foram muito baixas, impedindo a leitura. As transaminases diminuíram significativamente. Nos Grupos 2 e 3 houve diminuição nos níveis de sódio e cálcio, glicemia, creatinina e no ganho de peso e não houve alteração no potássio e nas porcentagens das células sanguíneas (no Grupo 3 reduziu-se a porcentagem de eosinófilos). No Grupo 4, a diminuição dos mesmos atributos foi maior, porém o potássio e a porcentagem de segmentados também se reduziram, sendo que as porcentagens de linfócitos e eosinófilos elevaram-se e a de monócitos não se alterou.

**Conclusões** - Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que: a) em ratos, a inalação crônica simultânea dos dois agentes anestésicos inalatórios (halotano e óxido nitroso) ocasionou alterações maiores do que a inalação isolada de cada um, mantendo-se a mesma concentração (halotano a 50 ppm e óxido nitroso a 400 ppm; b) apesar das alterações bioquímicas, nas porcentagens das células sanguíneas e no ganho de peso, o estudo histopatológico nada revelou de anormalidade.

**UNITERMOS** - ANESTÉSICOS, Gasoso: óxido nitroso; Volátil: halotano; **COMPLICAÇÕES**: contaminação, poluição.

## RESUMEN

Vane LA, Castiglia YMM, Ramos MD, Bacchi CE, Gushiken T, Mira LR, Curi PR - Efectos de Sub-Dosis de Halotano y Oxido Nitroso en Ratonas

**Justificativa y Objetivos** - La inhalación crónica de agentes anestésicos, por un mecanismo re-

sidual-adictivo, produce alteraciones orgánicas que traen consecuencias nocivas para la salud. El objetivo de este estudio experimental fue evaluar las alteraciones orgánicas producidas por la exposición crónica a halotano y óxido nitroso en animales.

**Método** - Los efectos de sub-dosis de anestésicos generales inhalatorios fueron estudiados en 80 ratones, 40 machos y 40 hembras, divididos en 4 grupos de 20. Grupo 1: animales respirando aire ambiental; Grupo 2: halotano a 50 ppm; Grupo 3: óxido nitroso a 400 ppm y Grupo 4: halotano a 50 ppm y óxido nitroso a 400 ppm. Fueron evaluados células sanguíneas (neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfocitos y monocitos), iones sanguíneos (sodio, potasio y calcio), enzimas (transaminasa glutâmico-pirúvica y glutâmico-oxalacética), hormonas (estradiol y prolactina) y glicemia y creatinina. Fue anotado el aumento de peso. Se hizo examen histopatológico en cerebro, corazón, hígado, riñón, ovario, testículo, estómago, médula ósea y aorta. La exposición a los gases fue de 6 horas por día en 180 días.

**Resultados** - El estudio histopatológico fue normal en todos los grupos. Los niveles de estradiol y prolactina no pudieron ser detectados con el método usado. En el Grupo 2 y 3 hubo disminución de sodio e calcio, glicemia y creatinina, así como del aumento de peso. En el Grupo 3 hubo disminución del porcentaje de eosinófilos y decreció el número de células sanguíneas. El Grupo 4 presentó la mayor incidencia de reducción de valores, habiendo también disminución de potasio, con aumento de eosinófilos y linfocitos, disminución de neutrófilos segmentados, en tanto que los monocitos permanecieron igual.

**Conclusión** - Podemos concluir que en ratones la inhalación crónica simultánea de halotano y óxido nitroso ocasionó mayores alteraciones comparado con la inhalación de cada uno de los agentes. El estudio histopatológico no reveló anormalidades aunque detectamos alteraciones bioquímicas, en el conteo de células sanguíneas y en la curva de aumento de peso.

## REFERÊNCIAS

01. Smith BE - Gas chromatography in the operating room. *Anesth Analg*, 1970; 49: 740-3.
02. Greene CD & Eastwood DW - Effect of nitrous oxide inhalation on hemopoiesis in rats. *Anesthesiology*, 1963; 24: 341-5.
03. Cameron H - Pollution control in the operation room: a simple device for removal of expired anesthetic vapour. *Can Anaesth Soc J*, 1970; 17: 535-9.
04. Bruce DL & Bach MJ - Psychological studies of human performance is affected by traces of enflurane and nitrous oxide. *Anesthesiology*, 1975, 42: 194-6.
05. Almeida GP -O anestesiológista e o stress. *Rev Bras Anestesiologia*, 1976; 26: 224-9.
06. Nunn JF, Sturrock J, Howell A - Effect of inhalation anaesthetics on division of bone marrow & cells in vitro. *Br J Anaesth*, 1976; 48: 75.
07. London MJ & Toothill VJ - Effects of nitrous oxide on placental methionine synthetase activity. *Br J Anaesth*, 1986; 58: 524-7.
08. Lassen HCA, Henricksen E, Neurich P et al - Severe bone marrow depression after prolonged nitrous-oxide anaesthesia. *Lancet*, 1956; 1: 527-32.
09. Lassen HCA & Kristensen HS - Remission in chronic myeloid leucoemia following prolonged nitrous oxide inhalation. *Dan Med Bull*, 1959; 6: 252-7.
10. Eastwood DW, Green CD, Lambdin MA et al - Effect of nitrous oxide on the whitecell count in leukemia. *New Engl J Med*, 1963; 268: 297.
11. Bruce DL & Koepke JA - Changes in granulopoiesis in the rat associated with prolonged halothane anaesthesia. *Anesthesiology*, 1966; 27: 811-14.
12. Parbrook GD - Leucopenic effects of prolonged nitrous oxide treatment. *Br J Anaesth*, 1967; 39: 119-24.
13. Nunn JF, Chanarin I, Tanner AG et al - Megaloblastic bone marrow changes after repeated nitrous oxide anaesthesia. *Br J Anaesth*, 1986; 58: 1469-74.
14. Chenoweth MB - Chronic toxicity of inhalation anaesthetics. *Ann R Coll Surg Engl*, 1971; 8:79-84.
15. Ueda I - The effects of volatile general anaesthetics on adenosine diphosphate-induced platelet aggregation. *Anesthesiology*, 1971; 34: 405-8.
16. Corbett TH, Cornell RG, Endres JL et al - Birth defects among children of nurse-anesthetists. In: Annual Meeting American Society of Anesthesiologists. Abstracts of scientific papers. Atlanta, 1973a; 183.
17. Corbett TH, Cornell RG, Endres JL, Millard RI - Effects of low concentrations of nitrous oxide on rat pregnancy. *Anesthesiology*, 1973b, 39: 299-301.
18. Corbett TH, Cornell RG, Linding K et al - Incidence of cancer among Michigan nurse-anesthetist. *Anesthesiology*, 1973c, 38: 260-8.
19. Corbett TH - Cancer and congenital anomalies associated with anaesthesia. *Ann N Y Acad Sci*, 1976; 271: 58-64.
20. Reis Jr A - Exercício da anesthesiologia, inalação crônica de anestésicos e risco profissional: cancerogênese. *Rev Bras Anestesiologia*, 1978a, 28: 438-45.
21. Viljanen MK, Kanto J, Vapaavuori M et al - Immunosuppression by halothane. *Br Med J (Clin Res)*, 1973; 3: 499-500.
22. Vaisman AI - Working conditions in surgery and their effect on the health of anesthesiologists. *Eksp Khir Anesteziol*, 1967; 3: 44-9.
23. Hawkins TJ - Atmospheric pollution in operating theatres; a review and a report on the use of reusable activated charcoal canisters, *Anaesthesia*, 1973; 28: 490-7.
24. Jenkins LC - Chronic exposure to anaesthetics: a toxicity problem? *Can Anaesth Soc J*, 1973; 20: 104-11.
25. Tomlin PJ, Jones BC, Edwards R et al - Subjective and objective sensory responses to inhalation of nitrous oxide and methoxyflurane. *Br J Anaesth*, 1973; 45: 719-23.
26. Bruce DL, Bach MJ, Arbit J - Trace anaesthetic effects perceptual, cognitive and motor skills, *Anesthesiology*, 1974a, 40: 453-8.
27. Frey R, Spierdijk J, Burn A et al - How strong is influence of chronic exposure to inhalation anaesthetics on personnel working in operating theatres. *Bull WFSA*, 1974; 6: 12.
28. Baez OR, Juarez Hernandez F, Vega-Ramos R - Riesgos profesionales del anestesiólogo. *Bol Inform Fed Soc Anest Republic Mex*, 1974; 3: 5.
29. Werthamn H - Beitrag zur chronischen atherin-toxikation der Chirurgen. *Beitzur Chir*, 1974; 178: 149-51,
30. Lezama CAA & Parra RF - Estadísticas de riesgo profesional en enfermeras, em: Riesgos a la salud en el personal del área quirúrgica. Steimberg D, Maneiro B, Argotti M, Aguilera C. Caracas, Publicaciones Científicas.Sociedad Venezolana de Anesthesiologia, 1976; 12: 109
31. Magalhães E - Risco profissional do anestesiológista. *Rev Bras Anestesiologia*, 1976; 26: 136-

- 47.
32. Maia JC & Gonçalves B - Exposição crônica dos anestésicos inalatórios. *Rev Bras Anesthesiol*, 1976; 26: 148-52.
33. Smith WDA - Pollution and the anaesthetist, in Hewer CL & Atkinson RS - Recent advances in anaesthesia and analgesia. London, Churchill Livingstone, 1976; 7: 131.
34. Burns BD, Robson JG, Welt PJJ - The effects of nitrous oxide upon sensory thresholds. *Canad Anaesth Soc J*, 1960; 7: 411-6.
35. Van Dyke RA - Metabolism of volatile anesthetics. III. Induction of microsomal dechlorinating and ether-clearing enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1966; 154: 364-9.
36. Tyrrel MF & Feldman SA - Headache following halothane anesthesia. *Br J Anaesth*, 1968; 40: 99-103.
37. Bruce DL - Halothane inhibition of phytohemagglutinin-induced transformation of lymphocytes. *Anesthesiology*, 1972; 36: 201-5.
38. Capon JH - Effects of general anesthetics on memory function in man. *J Comp Physiol*, 1973; 83: 294-7.
39. Salvini M, Binaschi S, Riva M - Evaluation of psychophysiological functions in humans exposed to trichlorethylene. *Br J Industr Med*, 1974; 28: 293-6.
40. Smith G, Shirley AW, Lees NW - The effect of inspiring low concentrations of halothane on working performance, in European Congress of Anesthesiology, 4<sup>o</sup>, Madrid, 1974. Abstracts of scientific papers. Amsterdam, Excerpta Medica, 1974; 135.
41. Wilkinson RT - Measuring the effects of environment upon performance. *Proc R Soc Med*, 1974; 67: 987-91.
42. Davison LA, Steinhelber JC, Eger EI et al - Psychological effects of halothane and isoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 1975; 43: 313-24.
43. Steinberg D, Maneiro B, Argotti M et al - Riescos a la salud en el personal del area quirurgica. Caracas, Sociedad Venezolana de Anestesiologia, 1976, 3: 15.
44. Reis Jr A - Exercício da anestesiologia e risco profissional: toxicidade de anestésicos inalatórios para o sistema nervoso central. *Rev Bras Anesthesiol*, 1978c; 28: 339-45.
45. Smith BE, Gans ML, Moya F - Investigation into the teratogenic effects of anesthetic agents. The fluorinated agents. *Anesthesiology*, 1965; 26: 260-6.
46. Fink BR, Shepard TH, Blandau RJ - Teratogenic activity of N<sub>2</sub>O. *Nature*, 1967; 214: 146-50.
47. Basford A & Fink BR - Teratogenic activity of halothane in rats. *Anesthesiology*, 1968; 29: 1167-73.
48. Cohen EN, Belville JW, Brown BW - Anesthesia, pregnancy and miscarriage. *Anesthesiology*, 1971; 35: 343-7.
49. Reis Jr A - Exercício da anestesiologia e risco profissional: abortogênese, teratogênese e infertilidade. *Rev Bras Anesthesiol*, 1978b; 28: 213-17.
50. Zar JH - Bioestatistical analysis. Englewood-cliffs, Prentice-Hall International Editions, 1984; 718.
51. Steinberg D & Ponte MC - Contaminación y exposición en el area quirurgica. *Rev Col Anest*, 1975; 2: 210-19.
52. Stollery BT, Broadbent DE, Lee WR - Mood and cognitive functions in anaesthetists working in actively scavenged operating theatres. *Br J Anaesth*, 1988; 61(4): 446-55.
53. Cascorbi HF - Biotransformation of drugs used in anesthesia. *Anesthesiology*, 1973; 39: 115-25.
54. Burm A, Spierdijk J, Reijger V - Contamination of the air in operating rooms with anaesthetic gases. IV Eur Congr Anaesth, 1974.
55. Cohen EN, Brown BW, Bruce DL et al - Occupational disease among operation room personnel. *Anesthesiology*, 1974; 41: 321-40.
56. Linde HW & Bruce DL - Occupational exposure of anesthesiologist to halothane, nitrous oxide and radiation. *Anesthesiology*, 1969; 30: 363-8.
57. Askrog V & Petersen R - Forcereniny of operations steer med luf Tformige anestetika og rontgenbestraling. *Nord Med*, 1970; 83: 501-3.
58. Stier A - The biotransformation of halothane (Correspondence). *Anesthesiology*, 1968; 29: 388-90.
59. Cousins M & Mazze RI - Methoxyflurane nephrotoxicity: study of dose response in man. *JAMA*, 1973; 225: 1611-6.
60. Franco G, Marracini P, Santagostino G, Filisetti P, Preseglio I - Behavior of urinary D-glucaric acid excretion in surgical patients and anaesthesiology staff acutely exposed to isoflurane and nitrous oxide. *Med-Lav*, 1991; 82: 527-32.
61. Corbett TH, Ball GL - Respiratory excretion of halothane after clinical and occupational exposure. *Anesthesiology*, 1973; 39: 342-5.
62. Sawyer DC, Eger II E, Bahlman SH et al - Concentration dependence of hepatic halothane metabolism. *Anesthesiology*, 1971; 34: 230-5.
63. Greene NM - The metabolism of drugs employed in anesthesia (I). *Anesthesiology*, 1968; 29: 127-44.

64. Nahrwold ML, Lecky JH, Cohen PJ - The effect of halothane on mitochondrial permeability to NAD. *Life Sci*, 1974; 15: 1261-5.
65. Biebuyck JF & Lund P - Effects of halothane and other anesthetic agents on the concentrations of rat liver metabolites in vivo. *Mol Pharmacol*, 1974; 10: 474-83.
66. Cohen PJ - Effects of anesthetics on mitochondrial function. *Anesthesiology*, 1973; 39: 153-64.
67. Cohen PJ - Metabolic effects of anesthesia. Annual Refresher Course, ASA, 22, 1971.
68. Blackburn WR, Ngai SH, Lindenbaum J - Morphologic changes in hepatic necrosis following halothane anesthesia in man. *Anesthesiology*, 1964; 25: 270-83.
69. Klatsking G & Kimberg DV - Recurrent hepatitis attributable to halothane sensitization in an anesthetist. *New Eng J Med*, 1969; 280: 515-22.
70. Holaday DA, Rudofsky S, Treuhuaf PS - The metabolic degradation of methoxyflurane in man. *Anesthesiology*, 1970; 33: 579-93.
71. Rosemberg PH & Wahlstrom T - Trifluoroacetic acid and some possible intermediate metabolites of halothane as haptens. *Anesthesiology*, 1973; 38: 224-7.
72. Stephen CR, Bourgeois-Gavardim M, Fabian LW - Fluothane: a preliminary report. *Anesthesiology*, 1957; 18: 174-7.
73. Jones WN, Margolis G, Stephen CR - Hepatotoxicity of inhalation anesthetic drugs. *Anesthesiology*, 1958; 19: 715-21.
74. Way WL, Cullen SC - An evaluation of halothane toxicity. *Am J Surg*, 1968; 115: 612-5.
75. Sawyer D & Eger II E - Hepatic metabolism of halothane. *Int Anesth Clin*, 1974; 12, 55-62.
76. Plummer JL, Hall MP, Jenner MA et al - Effects of chronic inhalation of halothane, enflurane or isoflurane in rats. *Br J Anaesth* 1986; 58: 517-23.
77. Brindle GF, Gilbert RG, Millar RA - Use of fluothane in anaesthesia for neurosurgery - a preliminary report. *Can Anaesth Soc J*, 1957; 4: 265-72.
78. Burns TH, Mushin WW, Organe GS et al - Clinical investigations of fluothane. *Br Med (Clin Res)*, 1957; 2:483-7.
79. Burnap TK, Galla SJ, Vandam LD - Anesthetic, circulatory and respiratory effects of fluothane. *Anesthesiology*, 1958; 19: 307-11.
80. Biebuyck JF, Saunders SJ, Harrison GG, Bull AB - Multiple halothane exposure and hepatic bromosulphthalein clearance. *Br Med J (Clin Res)*, 1970; 45: 668-71.
81. Endo M, Yokoyama H, Itoh T et al - The effects of various anesthetics on brain mitochondrial respiration. In: European Congress of Anesthesiology, 4<sup>o</sup>, Madrid, 1974. Abstracts of scientific papers, Amsterdam, Excerpta Medica, 1974; 139.
82. Ghoneim MM, Delle M, Wilson WR et al - Alteration of warfarin kinetics in man associated with exposure to an operation-room environment. *Anesthesiology*, 1975, 43: 333-6.
83. Nunn JF - Clinical aspects of the interaction between nitrous oxide and vitamin B12. *Br J Anaesth*, 1987; 59: 3-13.
84. Bruce DL & Koepke JA - Interaction of halothane and radiation in mice: possible implications. *Anesth Analg*, 1969; 48: 687-94.
85. Bruce DL & Wingard DW - The effects of anesthesia on transplant rejection. *Anesthesiology*, 1969; 30: 235-6,
86. Bruce DL & Koepke JA - Clinical implications of the effect of halothane on depressed rat bone marrow. *Anesthesiology*, 1971; 34: 573-6.
87. Lofstrom B & Schild B - Reticuloendothelial function under general anesthesia, in European Congress of Anesthesiology, 4<sup>o</sup>, Madrid, 1974. Abstracts of scientific papers. Amsterdam, Excerpta Medica, 1974; 141.
88. Griffith CDM & Kamath MB - Effect of halothane and nitrous oxide anaesthesia on natural killer lymphocytes from patients with benign and malignant breast disease. *BR J Anaesth*, 1986; 58: 540-3.
89. Nunn JF, Dixon KL, Lovis JD - The effects of halothane on mitosis. *Anesthesiology*, 1969; 30: 348-9.
90. Nunn JF, Sharp JA, Kimball KL - Reversible effect of inhalation anesthetic on lymphocyte mobility. *Nature*, 1970; 226: 85-6.