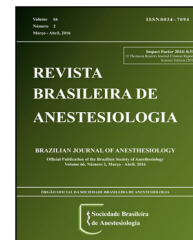




REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos da exposição repetida a diferentes concentrações de sevoflurano sobre o hipocampo de ratos neonatos



Omid Azimaraghi^a, Maryam Nezhad Sistani^b, Mohammad-Amin Abdollahifar^b, Ali Movafegh^a, Anahid Maleki^c, Ebrahim Soltani^c, Alireza Shahbakhani^d e Reza Atef-Yekta^{a,*}

^a Tehran University of Medical Sciences, Dr. Shariati Hospital, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Teerã, Irã

^b Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Department of Anatomical Sciences, Teerã, Irã

^c Tehran University of Medical Sciences, Children Medical Center Hospital, Department of Anesthesiology, Teerã, Irã

^d Tehran University of Medical Sciences, Dr. Ali Shariati Hospital, Anesthesiology Research Development Center, Teerã, Irã

Recebido em 14 de novembro de 2017; aceito em 4 de setembro de 2018

Disponível na Internet em 13 de novembro de 2018

PALAVRAS-CHAVE

Sevoflurano;
Hipocampo;
Ratos neonatais;
Estereologia;
Neurotoxicidade

Resumo

Justificativa e objetivos: O cérebro em desenvolvimento é mais vulnerável ao risco ambiental do que o cérebro já desenvolvido. Avaliamos os efeitos da exposição repetida a diferentes concentrações de sevoflurano sobre o hipocampo de ratos neonatos com o uso de métodos estereológicos.

Métodos: Dezoito ratos neonatos foram divididos aleatoriamente em três grupos. O Grupo A foi submetido à inalação de sevoflurano a uma concentração de 1,5%; o Grupo B foi submetido à inalação de sevoflurano a uma concentração de 3%; o Grupo C (controle) foi submetido à inalação de apenas oxigênio a 100%. Os tratamentos foram aplicados durante 30 minutos por dia, durante sete dias consecutivos. Volume do hipocampo, comprimento do dendrito, número de neurônios e número de células gliais foram avaliados em cada grupo com o uso de estimativas estereológicas.

Resultados: Identificamos uma redução de ~2% no volume do hipocampo no Grupo A em comparação com o Grupo C. O volume médio do hipocampo foi ~11% menor no Grupo B do que no Grupo C. Entretanto, essas diferenças no volume do hipocampo entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$ para todos). Quanto ao número de neurônios, encontramos um número significativamente menor de neurônios no Grupo A (~29% menos) e no Grupo B (~43% menos) do que no Grupo C ($p < 0,05$ para ambos). O comprimento do dendrito foi ~8% menor no Grupo A e ~1% menor no Grupo B que no Grupo C.

* Autor para correspondência.

E-mail: r.atefyekta@gmail.com (R. Atef-Yekta).

Conclusões: A exposição repetida ao sevoflurano, independentemente da concentração, reduziu o volume do hipocampo neonatal de camundongos, bem como o número de neurônios e o comprimento dos dendritos.

© 2018 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Sevoflurane;
Hippocampus;
Neonatal mice;
Stereology;
Neurotoxicity

Effects of repeated exposure to different concentrations of sevoflurane on the neonatal mouse hippocampus

Abstract

Background and objectives: Developing brain is more vulnerable to environmental risk than is the developed brain. We evaluated the effects of repeated exposure to different concentrations of sevoflurane on the neonatal mouse hippocampus using stereological methods.

Methods: Eighteen neonatal male mice were randomly divided into three groups. Group A, inhaled sevoflurane at a concentration of 1.5%; Group B, inhaled sevoflurane at a concentration of 3%; and Group C (control group), inhaled only 100% oxygen. Treatments were applied for 30 min a day for 7 consecutive days. The hippocampal volume, dendrite length, number of neurons, and number of glial cells were evaluated in each group using stereological estimations.

Results: We identified a ~2% reduction in the volume of the hippocampus in Group A compared to Group C. Mean hippocampal volume was ~11% smaller in Group B than it was in Group C. However, these differences in hippocampal volume between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$ for all). As for the number of neurons, we found significantly fewer neurons in Group A (~29% less) and Group B (~43% less) than we did in Group C ($p < 0.05$ for both). The dendrite length was ~8% shorter in Group A and ~11% shorter in Group B than it was in Group C.

Conclusions: Repeated exposure to sevoflurane, regardless of the concentration, reduced the volume of the neonatal mouse hippocampus, as well as the number of neurons and dendrite length.

© 2018 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

O desenvolvimento normal do cérebro depende da formação apropriada de sinapses neuronais e do fluxo adequado de informações entre os neurônios durante o processo de sinaptogênese.¹ O período de crescimento rápido do cérebro (PCRC) é um período extenso de crescimento e maturação cerebral que ocorre durante o desenvolvimento do cérebro de mamíferos. Em humanos, o PCRC começa durante o último trimestre de gravidez e se estende ao longo dos dois primeiros anos de vida.² Em roedores, o PCRC ocorre durante o período neonatal.³ Pesquisas mostram que a exposição neonatal a xenobióticos durante o PCRC pode afetar negativamente o desenvolvimento do cérebro neonatal, resultar em prejuízo da função cognitiva em rato adulto.⁴ Contudo, os efeitos de agentes anestésicos específicos, como o sevoflurano, sobre o desenvolvimento do cérebro ainda são obscuros.

O sevoflurano é um éter metil isopropílico altamente fluorado, de cheiro adocicado, não inflamável que é frequentemente usado como agente anestésico inalatório para induzir anestesia através de uma máscara facial em crianças, devido ao seu rápido início de ação e curta duração.⁵ A característica mais importante do sevoflurano, em comparação com anestésicos mais antigos como isoflurano ou halotano, é a sua menor solubilidade no sangue, o que permite que o

nível de sevoflurano no cérebro aumente mais rapidamente durante a indução anestésica.^{6,7} A concentração alveolar mínima (CAM) de sevoflurano, ou seja, a concentração de sevoflurano nos pulmões necessária para impedir o movimento (resposta motora) em 50% dos indivíduos em resposta a um estímulo cirúrgico (dor), diminui à medida que a idade aumenta. CAMs maiores são necessárias quando se administra sevoflurano durante os períodos neonatal e infantil.⁸ Infelizmente, os efeitos que exposições repetidas a diferentes concentrações de sevoflurano podem ter no cérebro em desenvolvimento permanecem desconhecidos.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos que exposições repetidas a diferentes concentrações de sevoflurano têm no hipocampo de ratos neonatos com o uso de estimativas estereológicas.

Métodos

Preparação dos animais e dos cérebros

Dezoito ratos machos neonatos foram obtidos do IR Instituto Pasteur Iraniano (Teerã, Irã). Todos os ratos experimentais eram produto do acasalamento entre ratos adultos machos e fêmeas que foram mantidos em abrigos para animais sob condições-padrão em temperatura de 22–24 °C e em um

ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso a alimentos e água. Após o acasalamento, o processo de gravidez foi acompanhado até o parto.

Quarenta e oito horas após o nascimento, os ratos neonatos foram colocados em caixas plásticas conectadas a uma máquina anestésica através de um tubo. Os animais foram alocados aleatoriamente em três grupos: o Grupo A (seis ratos neonatos machos com 48 h de vida) recebeu sevoflurano a 1,5% durante 30 minutos por dia por sete dias consecutivos; o Grupo B, (seis ratos neonatos machos com 48 h de vida) recebeu sevoflurano a 3% durante 30 min/dia por sete dias consecutivos; os seis ratos do Grupo C (controle), também com 48 h de vida, receberam oxigênio a 100% durante 30 min/dia por sete dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último tratamento com sevoflurano, os ratos foram decapitados e os cérebros completamente extirpados através de uma incisão na linha média do crânio. Em seguida, os hemisférios direitos foram imersos em formalina tampoadada neutra. Posteriormente, os tecidos foram processados, embebidos em parafina, seccionados através de cortes coronais seriados (26- μ m de espessura) e corados com violeta de cresila (1% de acetato de cresila violeta em água destilada). Além disso, os blocos dos hemisférios esquerdos foram processados para o procedimento de impregnação de Golgi. Neurônios necróticos foram estudados através da coloração com hematoxilina e eosina.

Determinação do volume hipocampal com o uso de estereologia

A localização do hipocampo em várias secções foi identificada com o Atlas Paxinos. A técnica de Cavalieri foi usada para determinar o volume do hipocampo. Primeiro, o tecido foi seccionado em série. Em seguida, 10 cortes de tecido foram selecionados aleatoriamente. Um microscópio de projeção (Nikon®, Japão) com ampliação final de 100 $\times$ e uma ponta de prova foram usados para determinar o volume do hipocampo (em μ m³). A ponta de prova tinha uma grade de pontos, que foi sobreposta aleatoriamente sobre as secções de tecido em três regiões (CA1, CA2 e CA3), e o volume foi estimado com a seguinte equação: $V = \Sigma p \times (a/p) \times d$, onde Σp é o número de pontos que atingem o volume do hipocampo, a/p é toda a superfície do ponto, conforme calculado com a equação abaixo e um compasso no microscópio, e d é a distância entre as secções amostradas $a/p = (\Delta x \times \Delta y)/M^2$.

Na equação acima, Δx e Δy são as distâncias entre os pontos nos eixos x e y e M^2 é o quadrado da ampliação do microscópio.

Determinação do número de neurônios no hipocampo

A técnica do dissecador ótico foi usada para determinar o número de células no hipocampo, inclusive o número de neurônios, células gliais e neurônios degenerativos. Uma estrutura de contagem projetada especificamente para contagem de células foi usada. Todo o campo visual de cada secção (25- μ m de espessura) foi avaliado com um microscópio com o uso de uma lente objetiva de 40 $\times$ (BX41TE; Olympus, Japão). De acordo com o método de contagem

de grade, as células com seus núcleos dentro da grade ou na borda da grade foram contadas, enquanto aquelas com os núcleos fora das linhas da grade não foram contadas. Então, a densidade numérica das várias células do hipocampo foi calculada com a seguinte equação: $Nv = (\sum_{i=1}^n Q) / (h \times \sum_{i=1}^n p \times a/f)$, onde $\sum_{i=1}^n Q$ é a soma das células contadas, $\sum_{i=1}^n p$ é a soma dos pontos que atingem os campos de seleção, h é a altura a partir da qual a contagem foi feita e a/f é a proporção da área enquadrada em relação ao tecido real.

Determinação do comprimento dendrítico do neurônio hipocampal

Os cortes de tecido (26- μ m de espessura) que foram corados pelo método de Golgi foram usados para estimar o comprimento dendrítico dos neurônios do hipocampo. Algumas regiões do hipocampo foram projetadas no monitor com o uso de um microscópio (E-200; Nikon) equipado com uma lente objetiva (40 $\times$ e 1,4 de abertura numérica). Então, o comprimento do dendrito foi medido com o uso de uma grade cicloide, que foi colocada sobre os dendritos hipocampus paralelamente ao eixo vertical. Para estimar o comprimento do dendrito, todos os cortes transversais entre os eixos dos dendritos e os cicloides foram medidos e então estimados com o uso da seguinte equação: $T_N = 2 \times (a/l) \times (1/asf) M^{-1} \Sigma l$, na qual a/l é a área de exame ao longo de cada cicloide, asf é uma área relacionada à grade do cicloide, M é a ampliação a 4000 $\times$ e Σl é a soma dos cortes transversais entre os dendritos e a grade cicloide.

Análise estatística

Os dados coletados foram comparados entre os grupos por meio de testes estatísticos não paramétricos, como os testes de Kruskal-Wallis e U de Mann-Whitney, que foram feitos com o *software* SPSS. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

Resultados

Volume do hipocampo

Nossas análises revelaram que o volume médio do hipocampo foi ~2% menor no Grupo A (inalação de sevoflurano a 1,5%) e 11% menor no Grupo B (inalação de sevoflurano a 3%) do que no Grupo C (grupo controle, inalação de oxigênio) (fig. 1). No entanto, as diferenças no volume do hipocampo entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$ para todos).

Comprimento do dendrito

As análises revelaram que os dendritos eram ~8% menores no Grupo A e ~11% menores no Grupo B do que no Grupo C (fig. 2). As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$ para todos).

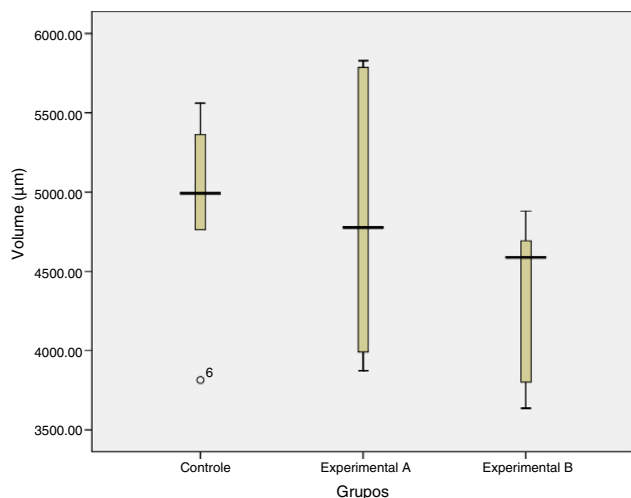


Figura 1 Distribuição do volume do hipocampo dos grupos de estudo. Grupo Experimental A: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 1,5%. Grupo Experimental B: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 3%; e Grupo C (controle): ratos neonatos que inalaram oxigênio a 100%. A figura mostra a diferença média no volume do hipocampo. O volume médio do hipocampo foi menor no Grupo A e no Grupo B em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$).

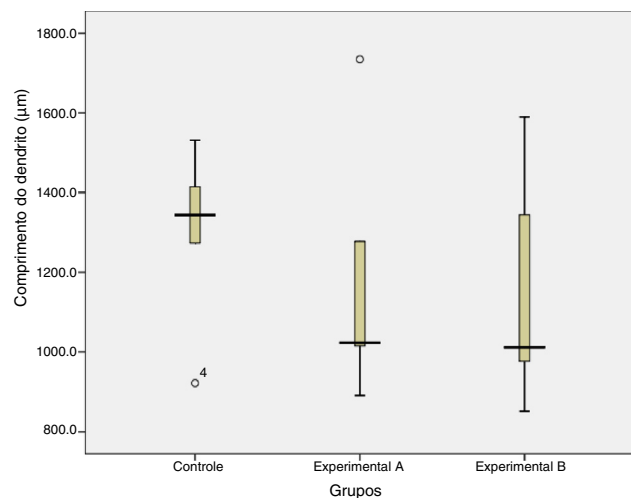


Figura 2 Distribuições dos comprimentos dos dendritos de neurônios hipocâmpais no estudo. Grupo Experimental A: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 1,5%. Grupo Experimental B: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 3%; e Grupo C (controle): ratos neonatos que inalaram oxigênio a 100%. A figura mostra a diferença média entre os comprimentos dos dendritos nos grupos de estudo. As análises revelaram que os dendritos foram menores no Grupo A e no Grupo B em comparação com o Grupo C. As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Contagens de células neuronais e gliais

Comparado ao Grupo C, ~29% e ~43% menos neurônios foram encontrados nos Grupos A e B, respectivamente, e essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$ para ambos). No entanto, as contagens de

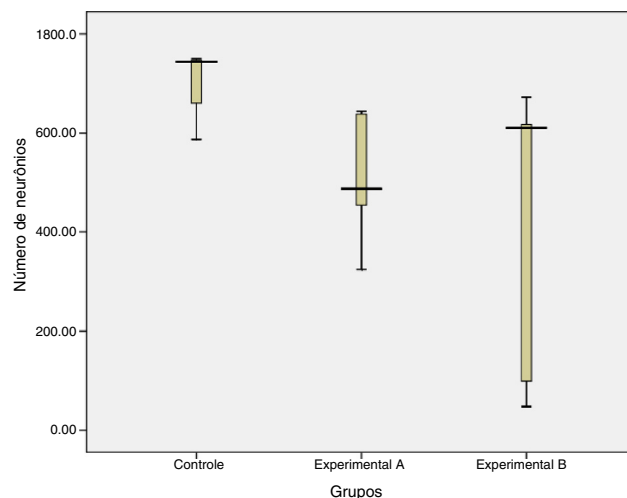


Figura 3 Distribuição do número de neurônios do hipocampo nos grupos de estudo. Grupo Experimental A: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 1,5%. Grupo Experimental B: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 3%; e Grupo C (controle): ratos neonatos que inalaram oxigênio a 100%. Menos neurônios foram encontrados nos Grupos A e B e essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

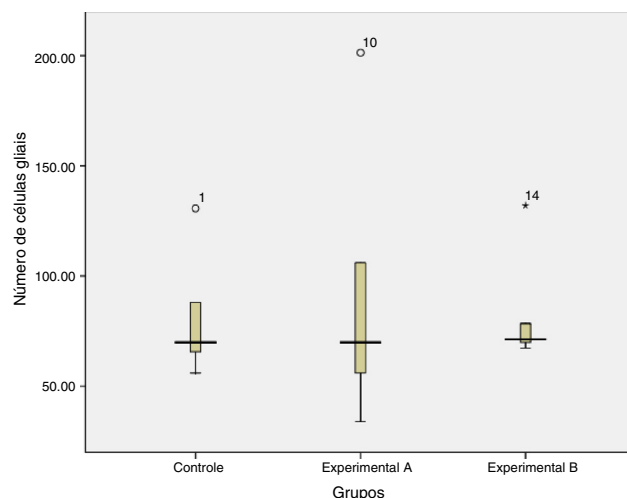


Figura 4 Números de células gliais do hipocampo nos grupos de estudo. Grupo Experimental A: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 1,5%; Grupo Experimental B: ratos neonatos que inalaram sevoflurano a 3%; e Grupo C (controle): ratos neonatos que inalaram oxigênio a 100%. Quanto à contagem de células gliais, nossas análises demonstraram mais células gliais no Grupo A e no Grupo B em comparação com o Grupo C. No entanto, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

neurônios dos Grupos A e B não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) (fig. 3).

Quanto à contagem de células gliais, nossas análises demonstraram ~12% a mais de células gliais no Grupo A e ~2% a mais de células gliais no Grupo B em comparação com o Grupo C. No entanto, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$ para todos) (fig. 4).

Discussão

O presente estudo determinou os efeitos que a exposição repetida a diferentes concentrações de sevoflurano teve no hipocampo de ratos neonatos com o uso de usando estimativas estereológicas. Os resultados sugerem que a exposição repetida ao sevoflurano, independentemente da concentração, reduz o volume do hipocampo, o número de neurônios e o comprimento dos dendritos em ratos neonatos. Também descobrimos que todas essas reduções foram um pouco mais acentuadas quando uma concentração maior de sevoflurano foi usada. Embora os volumes do hipocampo, a contagem de neurônios e o comprimento dos dendritos não tenham sido significativamente diferentes entre as duas concentrações de sevoflurano testadas, as diferenças podem ser importantes clínica e fisiologicamente.

Muitos estudos abordaram os efeitos em curto e longo prazo dos anestésicos voláteis sobre a neurogênese e as funções neurocognitivas. Embora vários pesquisadores tenham sugerido que o sevoflurano possa ter efeitos prejudiciais no cérebro durante a infância, existem discrepâncias em relação a dose, duração e tempo de exposição que podem causar efeitos prejudiciais.⁹⁻¹² Em estudo anterior, Zhou et al. avaliaram os efeitos da administração de diferentes doses de sevoflurano sobre o cérebro em desenvolvimento e mostraram que doses mais altas de sevoflurano levam a alterações histopatológicas e apoptose no hipocampo de ratos neonatos, bem como déficits neurocognitivos temporais.¹³ Nossos dados são consistentes com esses achados anteriores, embora tenhamos usado diferentes concentrações de sevoflurano e diferentes métodos de avaliação das alterações no hipocampo. Em outro estudo, Wang et al. verificaram que ratos com sete dias de vida expostos ao sevoflurano a 2,5% por 4h apresentaram comprometimento significativo da memória espacial e da memória, conforme determinado pelo teste do labirinto aquático de Morris.¹⁴ Além disso, Fang et al. descobriram que múltiplas exposições maternas ao sevoflurano inibiram a neurogênese nos cérebros em desenvolvimento de fetos de ratos e revelaram que essa inibição era regulada pela via Pax6.¹⁵ Em contraste, Chen et al. demonstraram que a exposição a uma baixa concentração de sevoflurano realmente aumenta a neurogênese do hipocampo em ratos neonatos.¹⁶

A maioria dos estudos acima mencionados sustenta que a exposição precoce ao sevoflurano pode induzir déficits neurocognitivos em longo prazo, potencialmente por meio de apoptose neuronal. No entanto, um estudo conduzido por Lu et al. sugeriu que a apoptose neuronal pode não contribuir para a disfunção cognitiva em longo prazo, observada após a exposição ao sevoflurano a 2%, mas sim que os efeitos do neurodesenvolvimento induzido por sevoflurano podem depender de vários fatores.¹⁷

Neste estudo, avaliamos as alterações do hipocampo induzidas por sevoflurano com o uso de estimativas estereológicas. Essa abordagem provavelmente produziu estimativas mais precisas do volume do hipocampo, da contagem de células neuronais e gliais e dos comprimentos dos dendritos do que as estimativas identificadas em relatos anteriores.

Do ponto de vista clínico, os efeitos mais pronunciados de estresse precoce mostraram efeitos nas estruturas anatômicas do hipocampo que afetam a saúde humana mais tarde.¹⁸ Estudos anteriores relataram pequenos volumes hipocâmpais antes da manifestação dos sintomas clínicos no transtorno depressivo maior.¹⁹ Atrofia do hipocampo e seus correlatos clínicos também foi relatada em indivíduos com doença de Alzheimer, com comprometimento cognitivo leve e em idosos controle, o que denota a importância da estrutura anatômica do hipocampo na manifestação de várias doenças.²⁰

Várias limitações de nosso estudo devem ser observadas. Primeiro, examinamos apenas o hipocampo. Assim, estudos adicionais sobre as mudanças que ocorrem em resposta ao sevoflurano em outras regiões do cérebro são necessários. Especialmente, estudos que enfoquem os possíveis efeitos em curto e longo prazo da exposição precoce ao sevoflurano no desenvolvimento dos sistemas motor e sensorial devem ser feitos. Em segundo lugar, estudamos apenas camundongos neonatos masculinos para reduzir a possibilidade de viés relacionado ao sexo no desenvolvimento do cérebro. Portanto, estudos que avaliem ambos os sexos são necessários para ajudar a esclarecer os efeitos do gênero nas alterações neuronais induzidas por sevoflurano. Finalmente, não investigamos os mecanismos subjacentes às alterações que observamos no hipocampo induzidas por sevoflurano. Embora as evidências adquiridas sobre as mudanças que ocorrem nos modelos animais em desenvolvimento após a exposição ao sevoflurano sejam certamente inegáveis, estudos contínuos sobre os mecanismos da apoptose induzida pela anestesia são essenciais.

Conclusão

Com o uso de estimativas estereológicas, o presente estudo revelou que a exposição repetida ao sevoflurano, independentemente da concentração, induziu reduções no volume do hipocampo, no número de neurônios e no comprimento dos dendritos de ratos neonatos. Dado que o sevoflurano é usado diariamente para induzir e manter a anestesia em salas cirúrgicas pediátricas e dado o número crescente de bebês prematuros submetidos a uma variedade de cirurgias, é essencial entender os possíveis efeitos que a anestesia e a cirurgia podem ter em bebês e crianças pequenas para determinar até que ponto os riscos superam os benefícios e a cirurgia não deve ser feita. Nosso estudo fornece dados que aumentam nosso conhecimento sobre os efeitos que os agentes anestésicos exercem sobre o cérebro em desenvolvimento.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Às equipes do Hospital Dr. Shariati e do Laboratório de Animais da Universidade de Ciências Médicas de Teerã que nos ajudaram nesta pesquisa. Os autores também são gratos ao Centro de Pesquisa em Urologia Pediátrica por apoiar

este estudo. Este estudo foi financiado pela Universidade de Ciências Médicas de Teerã.

Referências

1. Jevtovic-Todorovic V. Developmental synaptogenesis and general anesthesia: a kiss of death? *Curr Pharm Des.* 2012;18:6225–31.
2. Mariussen E. Neurotoxic effects of perfluoroalkylated compounds: mechanisms of action and environmental relevance. *Arch Toxicol.* 2012;86:1349–67.
3. Viberg H, Fredriksson A, Jakobsson E, et al. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Toxicol Sci.* 2003;76:112–20.
4. Buratovic S. Low-dose ionizing radiation induces neurotoxicity in the neonate: acute or fractionated doses and interaction with xenobiotics in mice. Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis; 2016.
5. Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA. Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. *Pharmacotherapy.* 2005;25:1773–88.
6. Lerman J, Sikich N, Kleinman S, et al. The pharmacology of sevoflurane in infants and children. *Anesthesiology.* 1994;80:814–24.
7. Esper T, Wehner M, Meinecke CD, et al. Blood/gas partition coefficients for isoflurane, sevoflurane, and desflurane in a clinically relevant patient population. *Anesth Analg.* 2015;120:45–50.
8. Tokuwaka J, Satsumae T, Mizutani T, et al. The relationship between age and minimum alveolar concentration of sevoflurane for maintaining bispectral index below 50 in children. *Anaesthesia.* 2015;70:318–22.
9. Sikich N, Lerman J. Development and psychometric evaluation of the pediatric anesthesia emergence delirium scale. *Anesthesiology.* 2004;100:1138–45.
10. Kalkman CJ, Peelen L, Moons KG, et al. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology.* 2009;110:805–12.
11. Yip P, Middleton P, Cyna AM, et al. Cochrane review: non-pharmacological interventions for assisting the induction of anaesthesia in children. *Evid Based Child Health.* 2011;6:71–134.
12. Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. *Pediatrics.* 2012;130:476–85.
13. Zhou X, Li W, Chen X, et al. Dose-dependent effects of sevoflurane exposure during early lifetime on apoptosis in hippocampus and neurocognitive outcomes in Sprague-Dawley rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2016;8:111–9.
14. Wang SQ, Fang F, Xue ZG, et al. Neonatal sevoflurane anesthesia induces long-term memory impairment and decreases hippocampal PSD-95 expression without neuronal loss. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:941–50.
15. Fang F, Song R, Ling X, et al. Multiple sevoflurane anesthesia in pregnant mice inhibits neurogenesis of fetal hippocampus via repressing transcription factor Pax6. *Life Sci.* 2017;175:16–22.
16. Chen C, Shen FY, Zhao X, et al. Low-dose sevoflurane promotes hippocampal neurogenesis and facilitates the development of dentate gyrus-dependent learning in neonatal rats. *ASN Neuro.* 2015;7:1759091415575845.
17. Lu Y, Huang Y, Jiang J, et al. Neuronal apoptosis may not contribute to the long-term cognitive dysfunction induced by a brief exposure to 2% sevoflurane in developing rats. *Biomed Pharmacother.* 2016;78:322–8.
18. Marečková K, Mareček R, Bencurova P, et al. Perinatal stress and human hippocampal volume: findings from typically developing young adults. *Sci Rep.* 2018;16:4696.
19. Rao U, Chen LA, Bidesi AS, et al. Hippocampal changes associated with early-life adversity and vulnerability to depression. *Biol Psychiatry.* 2010;15:357–64.
20. Morra JH, Tu Z, Apostolova LG, et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Automated 3D mapping of hippocampal atrophy and its clinical correlates in 400 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and elderly controls. *Hum Brain Mapp.* 2009;30:2766–88.