

# Creación de un modelo de mielomeningocele en el feto de conejo\*

C. Grande<sup>1</sup>, M.A. Sancho<sup>1</sup>, J. Conill<sup>2</sup>, V. Julià<sup>1</sup>, A. Albert<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>3</sup>, E. Muñoz<sup>1</sup>, L. Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Cirugía Pediátrica, Unitat Integrada Hospital Clínic-Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona. <sup>2</sup>Servicio de Neurología, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona. <sup>3</sup>Centro de Diagnóstico Biomédico, Laboratorio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.

**RESUMEN:** Las disrafias espinales comportan paraplejía, incontinencia fecal, vejiga neurogénica, disfunción sexual, hidrocefalia y malformaciones esqueléticas en los recién nacidos. Su etiología y patogénesis todavía son desconocidas y probablemente multifactoriales.

**Objetivo.** Determinar si la exposición de la médula al espacio amniótico produce una lesión funcional e histológicamente similar al mielomeningocele del adulto.

**Material y métodos.** Se han utilizado 48 fetos de conejo, a los que se les ha realizado una espina bífida quirúrgica en el día 23 de gestación (normal: 31 días) mediante resección de un fragmento de piel de la región lumbosacra y laminectomía posterior. El feto con dicha lesión es reintroducido en el útero, dejándose continuar la gestación. En el día 30 se extraen los fetos operados y un grupo de fetos no operados como controles. Se les realiza una valoración clínico-neurológica, estudio de potenciales evocados somato-sensoriales de extremidades superiores e inferiores y estudio histológico del segmento vertebral y medular afectado.

**Resultados.** Ha habido 26 supervivientes, todos ellos con deformidad y falta de movilidad en las extremidades inferiores. Los potenciales evocados han mostrado que no hay respuesta al estímulo recibido desde las extremidades inferiores en los animales afectados de espina bífida y sí en las extremidades superiores y en los controles. El análisis anatómopatológico objetiva una médula espinal aplanada y descubierta. Conclusión. Este modelo de mielomeningocele en feto de conejo reproduce varias características de las disrafias espinales humanas, por lo que puede utilizarse para estudiar la fisiopatología de la espina bífida.

**PALABRAS CLAVE:** Cirugía fetal; Mielomeningocele; Cirugía experimental.

**Correspondencia:** C. Grande, Servicio de Cirugía Pediátrica, Hospital Sant Joan de Déu, Pg. Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona.

\*Trabajo presentado en el XL Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica

Trabajo financiado por la Beca de Investigación del Hospital de Sant Joan de Déu y la Beca nº 99/1141 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.

Recibido: Mayo 2001

Aceptado: Agosto 2001

## CREATION OF A MODEL FOR MYELOMENINGOCELE IN FETAL RABBITS

**ABSTRACT:** Spinal dysraphism causes paraplegia, fecal incontinence, neurogenic bladder, sexual dysfunction, hydrocephalus and skeletal abnormalities in newborns. Its aetiology and pathogenesis are still not known, and probably multifactorial.

**Aim.** To determine whether spinal cord exposition to the amniotic space causes a functional (impairment) and anatomic lesion similar to that of human myelomeningocele.

**Material and methods.** Forty-eight fetal rabbits underwent to create spina bifida on the 23rd gestational day (term is 31 days). The procedure consisted of lumbosacral skin excision and posterior laminectomy. The fetuses are allowed to continue their gestation. On the 30th gestational day the operated fetuses were harvested, together with a group of nonoperated littermates for control. A clinical and neurologic evaluation was done, as well a study of somato-sensorial evoked potentials in the upper and lower limb and histologic study of the affected vertebral and cordal segment.

**Results.** The 26 surviving animals had deformity and lack of movement of the lower limbs. Evoked potentials showed absent response to stimuli in the lower limbs of animals with spina bifida, whereas upper limbs and control animals did respond. Histologically the spinal cord of the operated rabbits was uncovered and flattened.

**Conclusion.** This model of myelomeningocele in fetal rabbit reproduces a variety of features similar to human spinal dysraphism, and hence can be used to study the pathophysiology of spina bifida.

**KEY WORDS:** Fetal surgery; Myelomeningocele; Experimental surgery.

## INTRODUCCIÓN

La espina bífida es el defecto nervioso central más frecuente de la neurocirugía pediátrica, con una prevalencia de 8 por 10.000 en España. Las anomalías asociadas, paraplejía, incontinencia fecal, vejiga neurogénica, disfunción sexual, hidrocefalia, malformaciones esqueléticas, hacen de ésta el defecto de desarrollo más complejo compatible con una supervivencia larga. La etiología y la patogénesis es todavía desconocida y probablemente multifactorial.

Hasta el momento se han creado modelos experimentales de espina bífida en monos, ratas, cerdos y cerdos, demostrando que la lesión creada experimentalmente es muy similar a la que presentan los fetos humanos afectados.

El objetivo del trabajo es la creación de un modelo de mielomeningocele en feto de conejo, para la posterior aplicación en el estudio de la espina bífida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Material.** Para este trabajo se han utilizado fetos de conejo de 23 días de gestación de raza blanca de Nueva Zelanda, recogidos 7 días después de la intervención (gestación completa, 31 días).

**Grupos de estudio.** Se comparan dos grupos de fetos humanos:

- a) Grupo de fetos con mielomeningocele: 48.
- b) Grupo de fetos controles: 20.

**Método.** La técnica anestésica y quirúrgica para intervenciones en el feto de conejo ha sido publicada con detalle anteriormente<sup>(1,2)</sup>. La coneja de 23 días de gestación se premedica por vía intramuscular con 10 mg/kg de ketamina y 2,5 mg/kg de clorpromacina. Una vez relajada, se rasura el abdomen, se administra una profilaxis antibiótica de 100 mg/kg de cefazolina en dosis única por vía intramuscular y 0,1 mg/kg de medroxicoprogevera para disminuir la contracción uterina durante la intervención. La anestesia es inhalatoria con halatone entre 2,5 y 4% en 1,5 litros de oxígeno.

La intervención quirúrgica se inicia practicando una laparotomía media, exteriorizándose únicamente el segmento uterino que va a ser intervenido.

**Técnica de mielomeningocele.** Se realiza mediante material de microcirugía y lupas. A través de una pequeña histerotomía se exterioriza el extremo caudal del feto. Se practica una incisión cutánea, circular, de 0,5 cm de diámetro sobre la columna lumbar del feto, a nivel de la cadera. Una vez reseca la piel, introducimos la punta de una tijera de microcirugía dentro del canal medular y seccionamos la parte posterior de la columna, consiguiendo así la laminectomía posterior. Con una ligera flexión del feto se comprueba la herniación de la médula a través del defecto. Una vez realizada la intervención, el feto se reintroduce en la cavidad uterina y se deja continuar la gestación.

**Recogida de muestras.** A los 7 días de la intervención se recogen los fetos por cesárea. Se reduce la premedicación de la madre a 5 mg/kg de ketamina y 2,5 mg/kg de clorpromacina y la anestesia es igualmente inhalatoria con halotane entre 2,5 y 4% en 1,5 litros de oxígeno. Los neonatos se mantienen calientes bajo una lámpara y se vigila minuciosamente sus movimientos respiratorios, reanimando aquellos que lo precisen. Se pesan e identifican.

**Exploración neurológica.** El protocolo de exploración es el siguiente:

1. Valoración del estado general a los 0 y a los 10 minutos en función de los movimientos respiratorios, coloración y actividad espontánea. Se han clasificado en tres grupos: mal estado general, regular estado general y buen estado general.
2. Determinación del grado de atrofia y deformidad de las extremidades inferiores (EEII) en tres grados: grado 3: EEII muy atróficas, con flexión severa y deformidades asociadas como pie equino-cavo-varo; grado 2: EEII con menos grado de atrofia, flexión acentuada y sin deformidades asociadas; grado 1: EEII discretamente flexionadas; grado 0: normal.
3. Clasificación del grado de parálisis de las extremidades inferiores en severa: prácticamente no mueve las extremidades, sólo hace una discreta extensión en respuesta al dolor; moderada: inicia espontáneamente una discreta extensión; ligera: realiza la extensión de las extremidades pero de manera incompleta y, por último, normal.
4. Presencia o ausencia de sensibilidad dolorosa superficial.
5. Movilidad espontánea o no.
6. Su reacción ante un plano inclinado de 45°; capacidad o no de trepar por él.

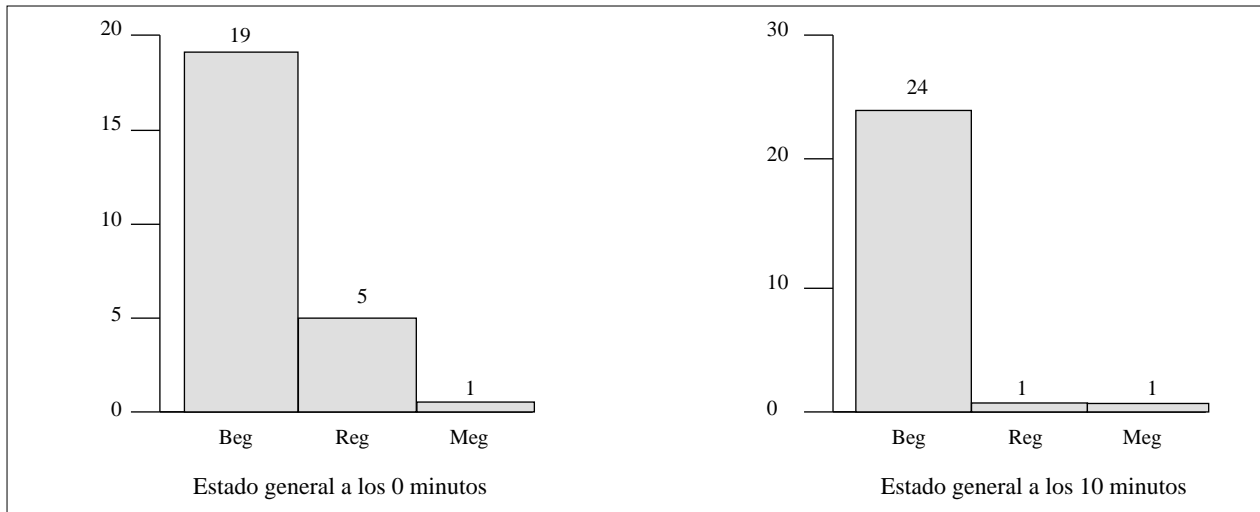
**Medida de potenciales evocados somatosensoriales.** Una vez realizada la exploración neurológica los neonatos se someten a sedación pentotal sódico intraperitoneal a dosis de 25 mg/kg. Se realiza una craneotomía lateral, tomando como referencia la órbita, para dejar expuesto el córtex parietal. Los potenciales han sido medidos con un aparato Medelec Sapphire IIe.

Los electrodos utilizados son:

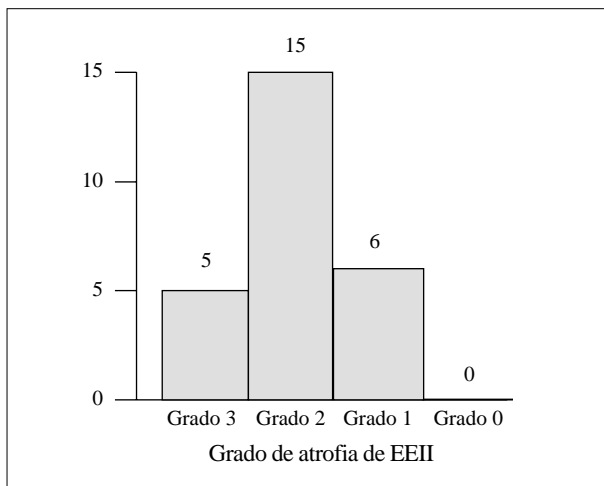
- Electrodos de estimulación: electrodos metálicos de anillas, colocados en la extremidad a medir.
- Electrodos de tierra: electrodos de aguja tipo anzuelo, colocados proximalmente al electrodo de estimulación y caudalmente al electrodo receptor.
- Electrodos de registro: electrodos nasofaríngeos en forma de bola de oro de 1 mm, colocados directamente sobre el córtex en un punto situado entre la órbita y el seno longitudinal.

Se recoge la latencia de aparición del estímulo en mseg, y la amplitud del estímulo en  $\mu$ V.

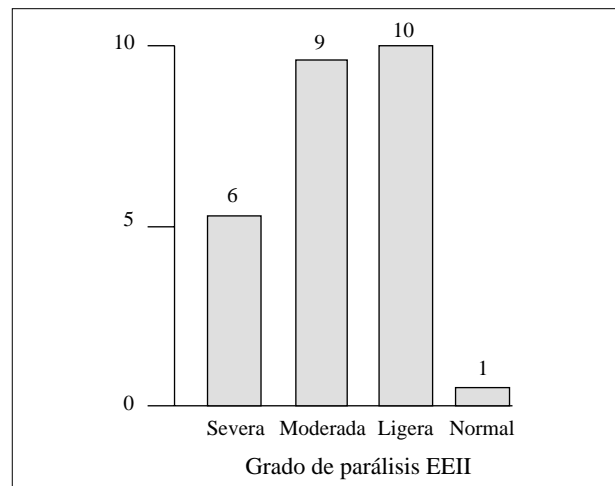
**Análisis histológico.** Una vez realizados los potenciales evocados los animales son sacrificados mediante una sobredosis de pentotal sódico intracardiaco. Son fijados en formol al 10% y embebidos en parafina. Se realizan secciones transversales completas mediante cortes de 3  $\mu$  y se tiñen con hematoxilina/eosina. Las muestras se han estudiado mediante microscopio óptico Olympus BH2, con software Olympus Microimage®, Berlín, GMBH. Se escoge un campo representativo de médula y se capta a 2x y 1x. Se ha analizado el grado de afectación de la médula y el grado de gliosis.



**Figura 1.** Estado general de los fetos con mielomeningocele a los 0 y a los 10 minutos.



**Figura 2.** Grado de atrofia de las extremidades inferiores.



**Figura 3.** Grado de parálisis de las extremidades inferiores.

## RESULTADOS

La supervivencia ha sido del 54,1% (26 de los 48 fetos operados). La media del peso al nacer ha sido de 31,73 g (18-40 g) en los operados y de 35,35 g (16-50 g) en los controles. Todos los controles han presentado buen estado general tanto a los 0 como a los 10 minutos, y el resto de exploración neurológica ha sido normal.

En cuanto a los animales operados, la exploración del estado a los 0 y los 10 minutos se resume en la Figura 1.

En todos los animales intervenidos existe atrofia de las EEII, el grado queda reflejado en la Figura 2. El grado de parálisis de las extremidades inferiores se resume en la Figura 3.

Todos los animales excepto dos han presentado alguna respuesta al estímulo doloroso, y solamente uno ha conseguido trepar por el plano inclinado.

En los controles se han conseguido realizar potenciales evocados tanto de las extremidades superiores como de las inferiores en 12 de los 20, en 7 en las EEII y en 1 en las EESS (Fig. 4). En cuanto a las EESS la media del período de latencia ha sido de 16,35 mseg (10,9-22,4 mseg) y la media de amplitud ha sido de 1,22  $\mu$ V (0,45-3,19  $\mu$ V). En las EEII la media del período de latencia ha sido de 35,42 mseg (21,4-45,8 mseg) y de la amplitud 1,56  $\mu$ V (0,27-5,23  $\mu$ V) (Fig. 5).

En 9 de los animales operados se han podido realizar potenciales evocados tanto de las EEII como de las EESS y en 5 sólo en las EEII. Los resultados de las EESS han sido: media período latencia: 17,4 mseg (11,6-30,8 mseg) y media de amplitud 1  $\mu$ V (0,38-3,21  $\mu$ V) (Fig. 5). De los 14 registros conseguidos en EEII cabe destacar que 13 han sido planos (Fig. 6).

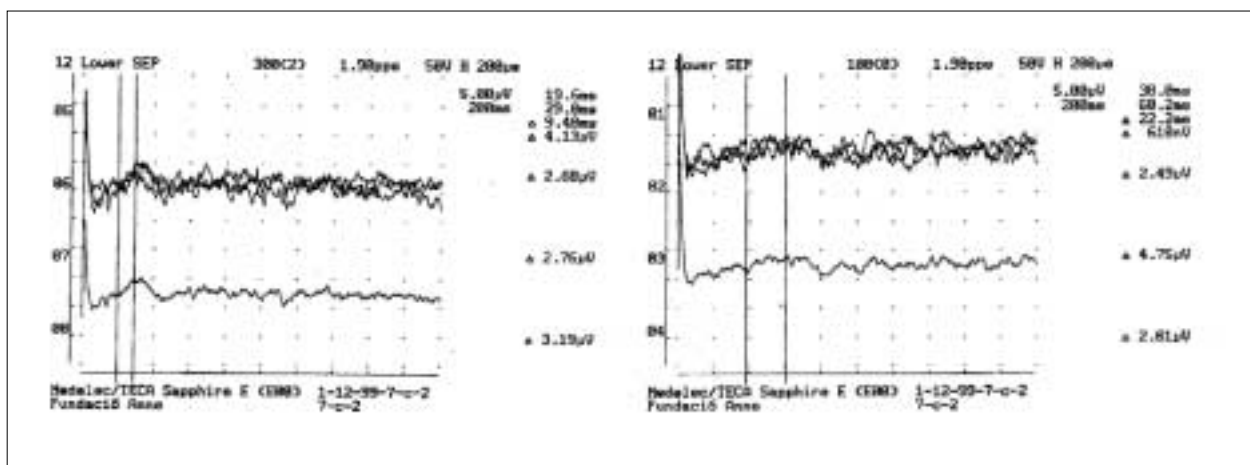


Figura 4. Potenciales evocados en un feto control.

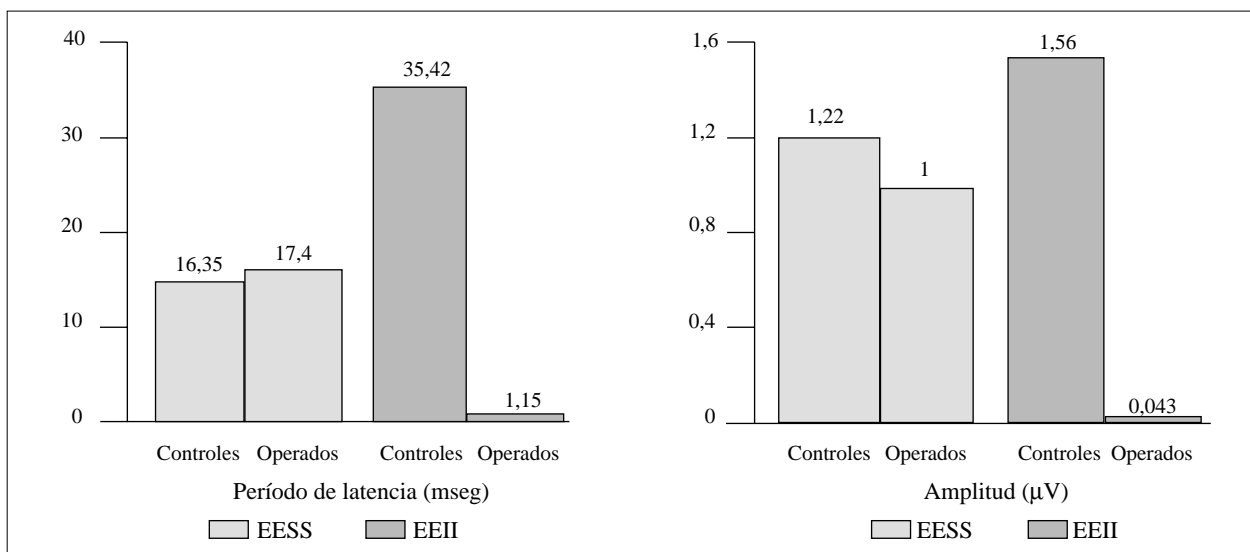


Figura 5. Media de período de latencia y amplitud.

Histológicamente en todos los animales con mielomeningocele se ha demostrado la lesión. En cuanto al grado de afectación medular los hallazgos se han clasificado de la siguiente manera: grado 0: normal; grado 1: vacuolización y edema perivascular, con pérdida neuronal; grado 2: hemorragia intraparenquimatosa; grado 3: epéndimo abierto, con pérdida de alas posteriores medulares, que da una imagen de médula aplanada (Fig. 7).

Los grados de gliosis han sido: grado 0: normal, distribución de las células gliales por la periferia de la médula, sin formar nódulos; grado 1: aumento de células gliales de forma discreta y formando nódulos, sobre todo en las alas posteriores; 12 han presentado grado 1 y 10 grado 0, coincidiendo éstos con el grado de afectación medular 3, en los que se han

perdido astas posteriores, que es donde se forman los nódulos de gliosis.

## DISCUSIÓN

Existen numerosos trabajos que investigan el mielomeningocele<sup>(3-7)</sup> pero su patogénesis es todavía poco conocida. La teoría clásica cree que esta malformación es debida a un desorden primario de la neuroregulación en las primeras fases del desarrollo embrionario del sistema nervioso central<sup>(3)</sup>. Una teoría actual defiende que el desorden primario no es neural sino de las estructuras del mesodermo: espina posterior, meninges y tejidos blandos que no se cierran dorsalmente y dejan ex-

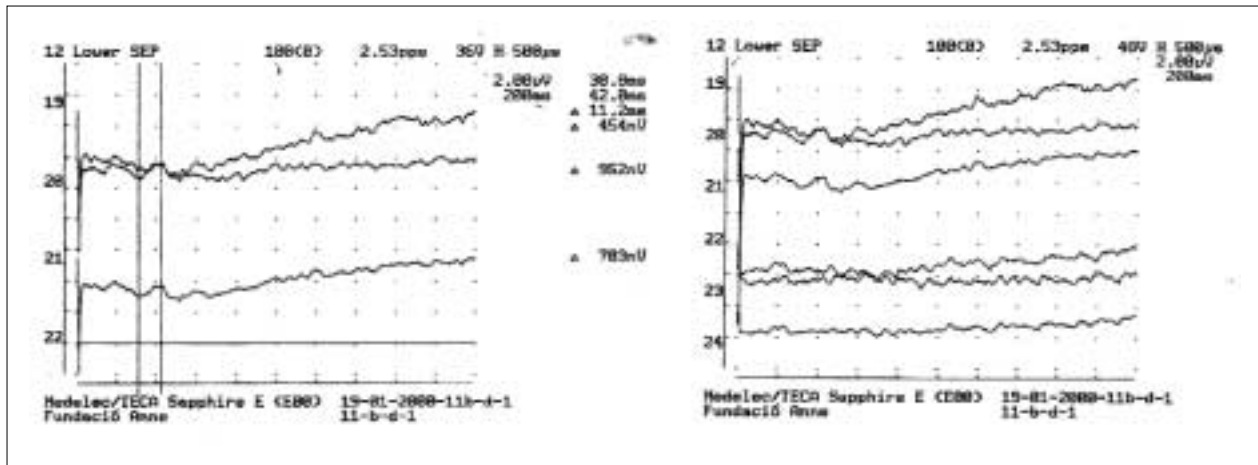


Figura 6. Potenciales evocados en un feto con mielomeningocele.

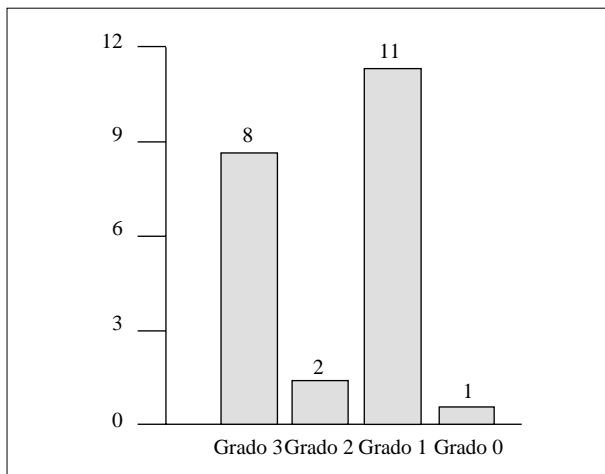


Figura 7. Grado de afectación de la médula.

puesta la médula espinal. El tejido neural desprotegido pero primariamente normal se lesiona progresivamente por factores mecánicos y posiblemente químicos durante el embarazo<sup>(4)</sup>.

Hasta el momento se han creado modelos experimentales de espina bífida en monos<sup>(5)</sup>, ratas<sup>(6)</sup>, cerdos<sup>(7)</sup> y corderos<sup>(8)</sup>. Se ha demostrado que la lesión creada experimentalmente es muy similar a la que presentan los fetos humanos afectados de espina bífida. Un estudio reciente hecho en fetos de cordero muestra que las lesiones neurales son más graves si el feto nace a término que si se extrae precozmente en el día 100 de gestación, que en el humano corresponde al sexto mes de embarazo<sup>(8)</sup>. También se han iniciado estudios experimentales para corregir el defecto intraútero. Meuli cubre el mielomeningocele en feto de cordero en el día 100 de gestación (a término, 145), con un colgajo de músculo *latissimus dorsi*. Comprueba que al nacer los fetos presentan una detención de la lesión neural y una recuperación de la función neurológica, respecto a los fetos afectados de mielomeningocele no tratado<sup>(9,10)</sup>.

Por tanto, el tercer trimestre de gestación tiene un papel muy importante en el progresivo deterioro de la médula espinal, tanto por factores químicos, como mecánicos.

En nuestro modelo en feto de conejo, los animales muestran al nacer una afectación de las extremidades inferiores con atrofia, deformidad y parálisis. Los potenciales evocados somatosensoriales han mostrado la falta de potencial en las extremidades inferiores, estando conservadas las superiores, lo que confirma que la médula está intacta hasta el nivel de la lesión. Esta técnica, descrita ya en conejos de a partir de 10 días<sup>(11)</sup>, es la primera vez que se efectúa en feto de conejo y puede tener un interés extraordinario para evaluar diferentes tratamientos intraútero del mielomeningocele. Histológicamente se comprueba la afectación medular en grado variable.

Nuestros resultados muestran que la exposición de la médula espinal al espacio amniótico, en el último tercio de gestación, provoca una lesión clínica, funcional e histológicamente similar al mielomeningocele del humano.

La coneja de raza blanca (Nueva Zelanda) es animal barato, dócil, de gestación múltiple y fácil de conseguir todo el año, con un índice de fertilidad alto. La posibilidad de estudiar el mielomeningocele en este modelo animal facilita la comparación de grupos amplios. Como la gestación es corta se abrevia también el tiempo de espera hasta obtener los resultados, y el precio es asequible.

En este trabajo comprobamos que en el modelo se reproducen varias de las características del mielomeningocele humano, por lo que se puede utilizar ventajosamente para estudios de fisiopatología y evaluación de los efectos de los posibles tratamientos prenatales.

## AGRADECIMIENTOS

A la Fundació ANNE por ceder desinteresadamente el aparato de potenciales evocados para esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Albert A, Julià V, Morales L, Parri FJ. Gastroschisis in the partially extra-amniotic fetus: experimental study. *J Pediatr Surg* 1993;**28**:656-659.
2. Albert A, Julià V, Morales L, Díaz F, Peña MT. Un modelo experimental para la valoración del defecto del líquido amniótico. *Cir Pediatr* 1991;**4**:130-133.
3. Campbell LR, Dayton DH, Sohal GS. Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. *Teratology* 1986;**34**:171-187.
4. Hutchins GM, McGowan KD, Blakemore KJ. Spinal dysraphia: not a neural defect? *Am J Hum Genet* 1992;**51**:A319.
5. Michejda M. Intrauterine treatment of spina bifida: Primate model. *Z Kinderchir* 1984;**39**:259-261.
6. Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM y cols. The paralysis associated with myelomeningocele: Clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury. *Neurosurgery* 1990;**26**:987-992.
7. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD. Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 1995;**30**:1028-1033.
8. Heffez DS, Aryanpur J, Cuello Rotellini NA y cols. Intrauterine repair of experimental surgically created dysraphism. *Neurosurgery* 1993;**32**:1005-1010.
9. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD. In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:397-402.
10. Meuli-Simmen C, Meuli M, Scott Adzick N. Latissimus dorsi flap procedures to cover myelomeningocele in utero: a feasibility study in human fetuses. *J Pediatr Surg* 1997;**32**:1154-1156.
11. Li WB, Fujitani Y. Comparison in post-natal development between somatosensory and motor conduction in rabbits. *Brain and Development* 1991;**13**:40-46.