

El modelo de mielomeningocele en oveja presenta alteraciones cerebrales semejantes a las del humano y estas pueden ser prevenidas mediante cirugía fetal abierta

J.L. Encinas, M Germani, A. Luis, C Soto, F. Pederiva, L.F. Avila, M.A. García-Cabezas*, J.L. Peiró**, C.G. Fontecha**, R. Rodríguez***, M. López-Santamaría, J.A. Tovar

*Departamento de Cirugía Pediátrica, *Departamento de Anatomía Patológica. Hospital La Paz. Madrid. **Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. ***Servicio de Obstetricia. Hospital La Paz. Madrid.*

RESUMEN

Objetivo. Describir malformaciones cerebrales en el modelo de mielomeningocele (MMC) en oveja que pudieran asociarse a las alteraciones cognitivas observadas en humanos y determinar si algún tipo de abordaje prenatal es capaz de prevenirlas.

Métodos. Realizamos un MMC fetal en 33 ovejas preñadas entre los días 60 y 80. En 15 casos el defecto no fue corregido (grupo A); en 10 fue corregido mediante cirugía fetal abierta (grupo B); en 5 mediante cobertura fetoscópica con pegamento biológico (grupo C); y en 3 mediante la aplicación fetoscópica de un parche de sustituto de dura. Los cráneos y cerebros fueron examinados externamente y en cortes coronales. Buscamos hidrocefalia, alteraciones en la migración neuronal y malformación de Arnold-Chiari tipo II (AC-II) mediante H&E, Masson y el marcador neural S-100. Cuatro corderos sanos sirvieron de control.

Resultados. Siete animales en el grupo A (46%), 5 en el grupo B (50%), 2 en el C (40%) y 1 en el D (33%) nacieron a término mediante cesárea. Los del grupo A presentaron alteraciones en la migración neuronal, hidrocefalia y AC-II, no observadas en el grupo B o en los controles. Los cerebros del grupo C no presentaron hidrocefalia ni alteraciones en la migración, pero sí dilatación del cuarto ventrículo y un grado menor de herniación cerebelosa. En este grupo, las raíces nerviosas del defecto se encontraban cubiertas por una capa continua de material fibroso.

Conclusiones. El modelo de MMC en oveja presenta alteraciones en el desarrollo cerebral que podrían corresponderse con algunas de las alteraciones cognitivas de la enfermedad humana. La cobertura abierta puede prevenirlas completamente y la fetoscópica con pegamento parcialmente.

PALABRAS CLAVE: Mielomeningocele; Fetal; Oveja; Desarrollo neuronal; Cerebro.

Correspondencia: José Luis Encinas Hernández. Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital La Paz. Paseo de la Castellana, 281. 28046 Madrid. E-mail: encinas.j@tiscali.it

Jose Luis Encinas tiene un contrato de investigación PFSE del FIS. Federica Pederiva tiene un contrato de investigación de la CAM. Este trabajo ha sido subvencionado por la Fundación Mutua Madrileña y el Fondo de Investigación Sanitaria.

Trabajo presentado en el XLVII congreso de la SECP. 20 de Mayo 2009.

Recibido: Mayo 2009

Aceptado: Marzo 2010

PRENATAL TECHNIQUES TO PREVENT CENTRAL NERVOUS SYSTEM MALFORMATIONS IN THE SURGICALLY INDUCED MODEL OF MYELOMENINGOCELE

ABSTRACT

Aim. To describe central nervous system malformations in the surgically induced model of Myelomeningocele (MMC) and their prevention using different prenatal treatments.

Methods. MMC was surgically created in 33 fetal lambs. Fifteen did not undergo fetal repair (group A). Of the lambs that did undergo repair, 10 were repaired with open two layer surgical closure (group B), 5 with fetoscopic coverage using bioglue (group C) and 3 fetoscopically using a patch (group D). All procedures were recorded and lamb brains and spinal cords were examined grossly and microscopically in coronal sections for structural organization anomalies. Histopathological changes were assessed using HE and S-100 neural marker.

Results. Hydrocephalus, Arnold-Chiari type II (AC-II) malformation and some neuronal migration disorders were observed in group A. Brains from group B and D were not hydrocephalic and had neither cell migration disorders nor hindbrain herniation. Group C presents mild degrees of hydrocephalus and AC-II. In group C lumbar lesion was covered by fibrous tissue.

Conclusions. Some of the central nervous system abnormalities observed in human disease are present in the surgically induced model of MMC. In this model avoidance of fluid drainage using open fetal surgery limits malformation severity.

KEY WORDS: Myelomeningocele; Cortex; Gyral; Development; Brain.

INTRODUCCIÓN

El mielomeningocele (MMC) asocia varias alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral bien descritas por trabajos anatomopatológicos y radiológicos. Estas malformaciones suelen ser: hidrocefalia de ventrículos laterales y tercer ventrículo, disgenesia de cuerpo calloso, alteraciones en la migración neuronal y malformación de Arnold-Chiari tipo II (AC-II)^(1,2).

Estas malformaciones se relacionan con algunas alteraciones cognitivas, también bien conocidas, asociadas a la

enfermedad generalmente en forma de déficits no verbales⁽³⁾.

En el modelo de MMC en la oveja, han sido estudiadas principalmente la funcionalidad de las extremidades inferiores y la anatomía medular. También han descrito varios autores el AC-II y su corrección mediante cirugía fetal abierta^(4,5). Sin embargo, únicamente un estudio había centrado sus esfuerzos en el desarrollo neuronal cerebral del modelo fuera de las ya conocidas alteraciones de fosa posterior⁽⁶⁾.

En humanos, los datos preliminares de cobertura prenatal del defecto mediante cirugía fetal abierta se asocian a una mejoría de la conformación de cerebro y cerebelo y a una disminución a la mitad de la necesidad de colocación de una válvula de derivación ventrículo-peritoneal⁽⁷⁻⁹⁾.

Los problemas de la cirugía fetal abierta son el oligohidramnios y el parto pretérmino⁽¹⁰⁾, tratando de evitarlos autores de todo el mundo, han intentado simplificar la técnica de cobertura facilitando así su corrección endoscópica⁽¹¹⁻¹³⁾.

No existe ningún estudio experimental que enfrente los resultados sobre el desarrollo neuronal cerebral de la cirugía fetal abierta y de distintas técnicas endoscópicas en un modelo de MMC.

Nuestro objetivo fue describir si el modelo de MMC en oveja presenta alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral que pudieran relacionarse con las alteraciones cognitivas descritas en el humano y el posible efecto beneficioso sobre estas de distintos tipos de cobertura prenatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las ovejas preñadas fueron trasladadas a nuestras instalaciones una semana antes de la cirugía con acceso libre a comida y agua hasta las últimas 24 horas previas a la intervención. En todos los casos realizamos un estudio ecográfico que confirmara y datara la gestación. Las ovejas fueron intubadas y anestesiadas con Propofol (10 mg/kg) e Isoflurano 2-2,5% con oxígeno a 2 L/min. El dolor postoperatorio fue diagnosticado mediante cambios en el comportamiento y la marcha y tratado con parches de Fentanilo.

La creación del defecto ha sido descrita previamente^(4,5) y consiste en la realización de una laminectomía lumbar bilateral con apertura de la duramadre seguida de una mielotomía media. La longitud total del defecto fue de unos 3 cm.

Realizamos el defecto en 33 animales entre las semanas 60 y 80 de gestación; en 15 casos este no fue corregido prenatalmente (grupo A); en 10 el defecto fue corregido mediante cirugía fetal abierta con dos suturas continuas de dura y piel (grupo B); en 5 mediante la aplicación fetoscópica percutánea de un pegamento biológico (grupo C); y en 3 mediante la sutura de un sustituto de duramadre derivado del Goretex (Duragen®) y abordaje fetoscópico con tres puertos (grupo D).

La técnica fetoscópica de aplicación del pegamento no había sido descrita y se realizó mediante abordaje percutá-



Figura 1.

neo con control ecográfico usando un único trocar Cook (Check-Flo Introducer Set. Cook. RCF 10.0 38-J) compatible con una óptica Storz de 2 mm (11530 AA. Kart Storz). El pegamento sintético usado fue Cosseal® (Baxter) y se introdujo de manera percutánea a través de una aguja de veress con la punta cortada (Fig. 1). La técnica percutánea con tres trócares ha sido previamente descrita y se realizó con puertos de 3 mm fijados a la pared con balones de Fogarty introducidos a través de Abocaths paralelos a los puertos⁽¹⁴⁾. Posteriormente, se suturó un parche ovoideo de Duragen® sobre el defecto usando una sutura monofilamento no absorbible. Posteriormente los bordes fueron sellados con pegamento biológico pasando la aguja de veress a través de uno de los trócares. En los dos tipos de abordaje fetoscópico utilizamos Helio conectado a un insuflador de laparoscopia Storz, ya que el uso de CO₂ en fetoscopia puede asociarse a acidosis fetal⁽¹⁵⁾.

Las gestaciones continuaron hasta el día 140. Los corderos vivieron durante las primeras 24 horas durante las que se estudió la presencia de alteraciones en la marcha y seguidamente fueron sacrificados y perfundidos con Paraformaldehído al 7%.

Los corderos fueron decapitados y el sistema nervioso central (SNC) extraído en un bloque cerebro-medula. Los cráneos fueron explorados externamente y seccionados en su línea media en busca de malformación de ACII, descrita como tejido cerebelar bajo el foramen mágnum. Los cerebros fueron seccionados en su línea media y se tomaron fotografías de sus planos laterales y sagitales para posterior estudio de alteraciones groseras en la migración celular e hidrocefalia. El hemisferio cerebral izquierdo fue seccionado en cortes coronales de medio centímetro desde la comisura blanca anterior en sentido ventral y dorsal. Los bloques fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 6 µm que fueron teñidos con H-E, Masson y el marcador neuronal S-100. Cuatro animales sanos sirvieron como controles.

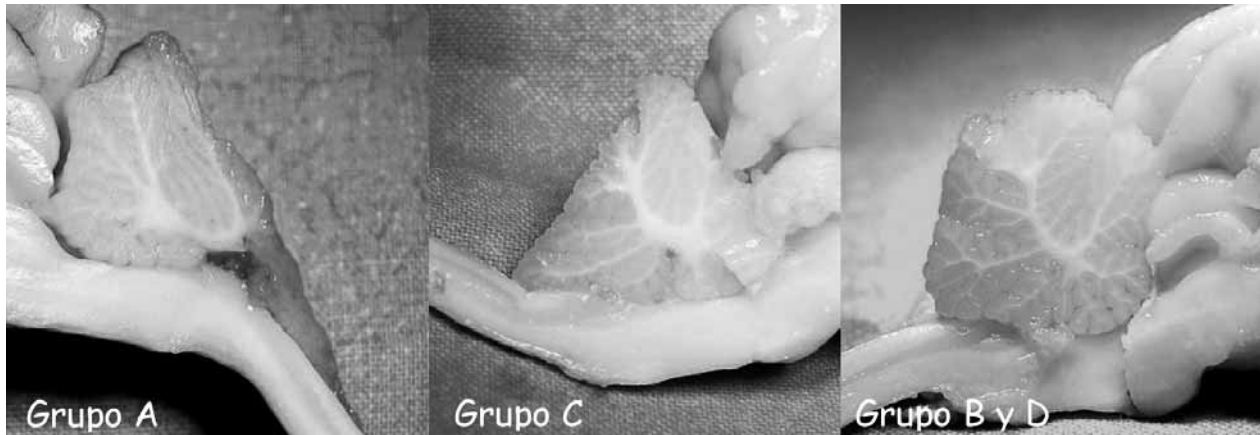


Figura 2. Grupo A: presencia de AC-II. Grupo C: grado intermedio de AC-II. Grupos B y D: ausencia de AC-II.

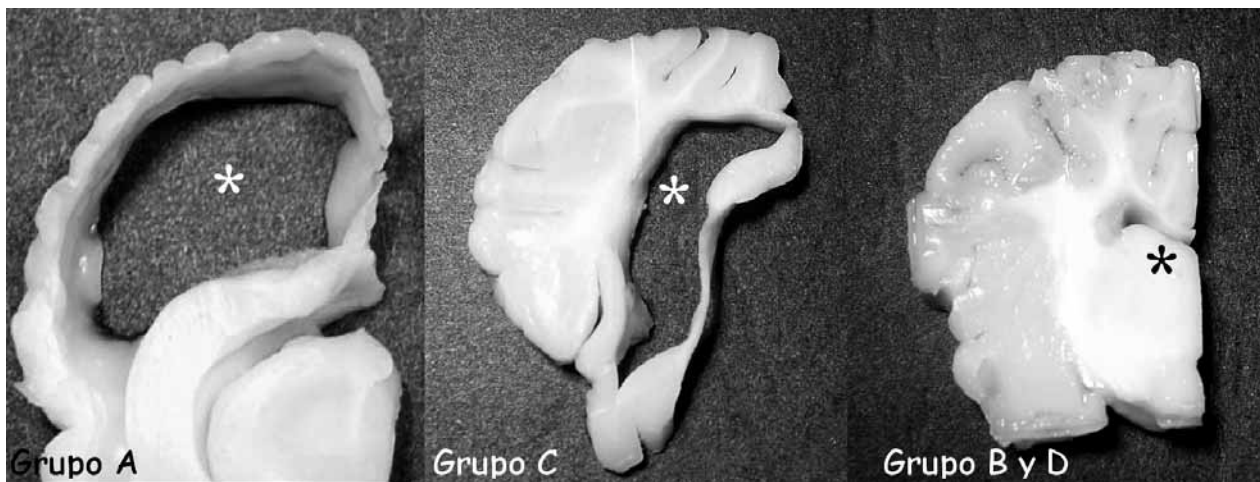


Figura 3. Grupo A: gran hidrocéfalia en ventrículos laterales. Grupo C: grado intermedio de hidrocéfalia en ventrículos laterales. Grupos B y D: ausencia de hidrocéfalia.

RESULTADOS

Diez y ocho animales murieron durante la gestación (18/33; 54%) con dos casos de muerte materna (2/33; 6%), lo que supone una mortalidad fetal y materna semejante a la descrita previamente por otros autores (4-6).

Siete animales en el grupo A (7/15; 46%), 5 en el grupo B (5/10; 50%), 2 en el grupo C (2/5; 60%) y 1 en el D (1/3; 33%) (n.s.) nacieron a término entre los días 140 y 145 de gestación. Las muertes en el grupo D fueron, en ambos casos, intraoperatorias por sangrado tras colocación percutánea de los puertos.

El tiempo del procedimiento en el grupo B fue de 40 min. \pm 11, en el grupo C de 40 min \pm 8 y en el D de 240 min \pm 41.

Aspecto del defecto y clínica

En el momento del cierre del defecto (en los grupos B y C) y al nacimiento en el grupo A, el MMC presentaba un

aspecto semejante al de la enfermedad humana, estando formado por una fina capa que contenía líquido y tejido nervioso medular abierto en su línea media. Clínicamente, los animales del grupo A eran parapléjicos, incontinentes para la orina y presentaban hipotrofia de sus cuartos traseros y diversas anomalías ortopédicas en forma de artrogriposis y escoliosis graves. Ninguno de los animales presentaba alteraciones craneales groseras, siringomiela o quistes cuadrigéminos.

Malformación de Arnold-Chiari tipo II

Cuatro animales del grupo A (4/7; 57%) presentaron malformación de AC-II no observada en ninguno de los animales de los grupos B, D o en los controles. Los animales del grupo C presentaron en un caso AC-II en un grado menor que el observado en el grupo A (Fig. 2).

Hidrocéfalia y alteraciones en la migración neuronal

En los animales de grupo A existía hidrocéfalia (Fig. 3) y alteraciones en la migración neuronal en forma de adelgaza-

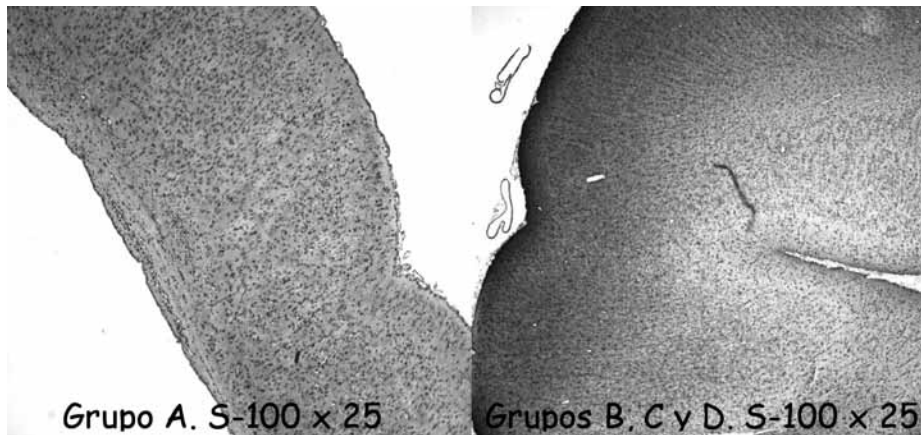


Figura 4. Grupo A: trastornos en la migración neuronal. Pérdida de estructura y adelgazamiento cortical con denudación endimaria. Grupos B, C y D: estructura cortical normal.

miento cortical temporal y pérdida de la estructura habitual (Fig. 4).

En algunas regiones, el epéndimo había desaparecido bruscamente y eran las regiones adyacentes a estas las que presentaban un mayor grado de alteración estructural (Fig. 4). También en el grupo A existían zonas de adelgazamiento del cuerpo calloso observadas únicamente en sus porciones posteriores.

Los animales del grupo C presentaban ligera hidrocefalia de los ventrículos laterales y uno de ellos una llamativa dilatación del tercer ventrículo no acompañada de alteraciones microscópicas en el tejido adyacente o estenosis en el acueducto de Silvio.

Ninguno de los animales del grupo B, D o los controles presentaron hidrocefalia, alteraciones corticales ni otras alteraciones en la migración neuronal.

Defecto lumbar

A término, los defectos lumbares en el grupo A se encontraban abiertos con grados variables de cierre espontáneo que no llegó a ser total en ningún caso. Los animales del grupo B presentaban el defecto completamente cerrado con un crecimiento normal de piel y anejos sobre él, mientras que en los animales del grupo C macroscópicamente el defecto se encontraba completamente abierto, aunque en los estudios microscópicos con H-E se pudo comprobar que existía una fina capa continua de tejido fibroso que cubría las raíces nerviosas. El animal del grupo D presentaba el defecto cerrado por completo.

DISCUSIÓN

Alteraciones en el desarrollo cerebral del modelo

Existe evidencia radiológica y anatomopatológica de la existencia de anomalías en el desarrollo neuronal cerebral en pacientes con MMC. Entre estas malformaciones se encuentran: hidrocefalia de ventrículos laterales y del tercer ventrículo, alteraciones en la migración neuronal, adelgazamiento cor-

tical temporal, disgenesia del cuerpo calloso, polimicrogiria y alteraciones en la conformación cerebelar y de la fosa posterior^(1,2).

Todas estas malformaciones han sido relacionadas por otras publicaciones con las alteraciones cognitivas particulares de los niños con MMC, descritas generalmente en forma de déficits de atención u orientación así como déficits cognitivos no verbales^(3,16,17).

El modelo de MMC en oveja presenta similitudes con la enfermedad humana en forma de paraplejia e incontinencia urinaria, así como malformación de AC-II y lesiones histológicas medulares semejantes^(4,5).

Von Koch, del grupo de tratamiento prenatal de San Francisco, realizó en el año 2005 el único estudio hasta esa fecha que buscaba alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral del modelo. No encontró hidrocefalia y las alteraciones cerebrales estaban limitadas a trastornos en la densidad axonal en un tracto nervioso particular relacionado con la fimbria⁽⁶⁾. Sus hallazgos en cuanto a AC-II fueron muy semejantes a los descritos previamente por la literatura⁽¹⁸⁻²⁰⁾. La principal limitación de este estudio fue quizá el pequeño número de animales. Nuestro grupo ha publicado recientemente algunas malformaciones cerebrales en el modelo que sugerían una similitud mayor con la enfermedad que las descritas por von Koch; sin embargo, el número de animales fue también muy reducido⁽²¹⁾.

Los animales con defecto no corregido de nuestro estudio actual mostraron alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral, semejantes a las descritas en las series humanas: hidrocefalia de ventrículos laterales y tercer ventrículo, alteraciones en la migración neuronal, disgenesia de cuerpo calloso y AC-II.

La etiología de la malformación de AC-II y de la hidrocefalia es controvertida. Algunas teorías localizan su origen en alteraciones en la conformación de la fosa posterior que impiden la correcta circulación de líquido cefalorraquídeo (LCR)⁽²²⁾. Otras más recientes describen la existencia de una denudación endimaria inicial que destruye la matriz germinal y modifica la absorción de LCR y precede a toda la cascada malformativa^(23,24).

En el modelo de oveja hemos podido comprobar la existencia de alteraciones en la migración celular cortical asociadas a áreas extensas de denudación endimaria sin AC-II o estenosis del acueducto de Silvio. El número de animales es reducido y no podemos establecer ninguna conclusión sólida en este sentido; sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que la denudación endimaria en este caso tuvo un papel inicial al describirse aislada y sin otra razón que explicara la presencia de hidrocefalia.

Nuestros hallazgos en el modelo en cuanto a AC-II son semejantes a los del resto de las publicaciones y son cercanos al 43% descrito por von Koch⁽⁶⁾. Los animales dentro del grupo de no corregidos que no presentaron AC-II tenían el defecto lumbar parcialmente cubierto o, en cualquier caso, de tamaño menor que los defectos abiertos y grandes que presentaban los animales con AC-II; hallazgo semejante al descrito por Meuli^(4,5) y que sugiere que la pérdida continua de LCR es un factor determinante en su desarrollo.

Eficacia de las distintas técnicas de cobertura prenatal del defecto

Meuli describió en sus primeros trabajos que la cobertura prenatal del defecto en el modelo mediante cirugía fetal abierta producía una reducción significativa del AC-II y cierta mejoría funcional en las extremidades inferiores, medida mediante potenciales evocados^(4,5). Von Koch no encontró diferencias significativas en el desarrollo axonal cerebral entre los animales corregidos y los no corregidos⁽⁶⁾.

En nuestro grupo, los animales corregidos mediante cirugía fetal abierta no mostraron alteraciones cerebrales significativas y, de hecho, fueron indistinguibles en todos los aspectos del grupo control.

Los animales corregidos mediante la técnica de cobertura percutánea con pegamento presentaron lesiones de gravedad intermedia. En estos casos no encontramos alteraciones de la migración neuronal pero sí hidrocefalia de los ventrículos laterales y dilatación del tercer ventrículo, pequeños cambios displásicos en los plexos coroideos y grados menores de AC-II. Esto sugiere que el pegamento cubre el defecto de manera efectiva durante un período de tiempo limitado, disminuyendo las consecuencias sobre el desarrollo cerebral de la pérdida de LCR, pero no previniéndolas por completo. El procedimiento es sencillo y con poco riesgo de sangrado.

La cobertura con tres trócares y una plancha de Duragen es considerablemente más compleja. El abordaje percutáneo con 3 puertos en un animal con cotiledones dispersos por la cavidad uterina multiplica el riesgo de sangrado, que fue la causa principal de muerte en este grupo. La cobertura en sí misma también es laboriosa y larga. Los resultados del grupo D, aunque semejantes a los de la cirugía fetal abierta, son cuestionables al existir un único superviviente. Los potenciales beneficios de las técnicas percutáneas en cuanto a disminución del parto pretérmino o mortalidad fetal no han podido ser establecidos probablemente por el pequeño tamaño de la muestra.

Este trabajo completa en parte los resultados preliminares publicados por nuestro grupo, sugiriendo con más solidez que algunas de las malformaciones cerebrales observadas en la enfermedad humana pueden deberse únicamente a la pérdida de LCR, quizá debido a modificaciones en la concentración de sus factores de crecimiento. Si esto es así, la cobertura prenatal del defecto estaría indicada, siendo el cierre completo mediante cirugía fetal abierta el procedimiento más efectivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hutchins GM, Meuli M, Meuli-Simmen C, Jordan MA, Heffez DS, Blakemore KJ. Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele. *Pediatr Path Lab Med.* 1996; 16: 701-2.
2. Juranek J, Fletcher J, Hasan K, Breier J, Cirino P, Pazo-Alvarez P, Diaz J, Ewing-Cobbs E, Dennis M, Papanicolau A. Neocortical organization in spina bifida. *Neuroimage.* 2008; 40: 1516-1522.
3. Fletcher JM, Copeland K, Frederick JA, Blaser SE, Kramer LA, Northrup H, Hannay HJ, Brandt ME, Francis DJ, Villareal G, Drake JM. Spinal lesion level in spina bifida: a source of neural and cognitive heterogeneity. *J Neurosurg.* 2005; 102: 268-79.
4. Meuli A, Simmen C, Hutchins GM. In utero surgery neurologic function at birth in sheep with spina bifida. *J Pediatr Surg.* 1995; 30: 342-7.
5. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Seller M, Harrison MR, Adkizt M. Creation of myelomeningocele in utero. A model of functional damage from spinal cord: exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg.* 1995; 30: 1028-32.
6. von Koch C, Compagnone N, Shinjiro H, Suzzane Y, Harrison M, Farmer D. Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obst Gynecol.* 2005 193: 1456-62.
7. Tulipan N, Hernanz- Schulman M, Bruner JP. Reduced hindbrain herniation after intrauterine myelomeningocele repair, a report of four cases. *Pediatr Neurosurg.* 1998; 29: 274-8.
8. Bruner JP, Tulipan L, Paschall RL. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA.* 1999; 282: 1819-25.
9. Jonnson M, Gerdes M, Rintoul N, Pasquariello P, Melchionni J, Sutton L, Adzick S. Maternal-fetal surgery for myelomeningocele: neurodevelopmental outcomes at 2 years of age. *Am J Obs Gynecol.* 2006 194: 1145-52.
10. Longaker MT, Gobus MS, Filly RA, Rosen MA, Chang SW, Harrison MR. Maternal outcome after fetal surgery. *JAMA.* 1991; 265: 737-41.
11. Bruner JP, Richar WO, Tulipan NB, Arney TL. Endoscopic coverage of myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 153-8.
12. Kohl T, Hartlage MG, Kiehitz D, Westphal M, Buller T, Achenbach S, Aryee S, Gembruch U, Brentrop A. Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endoscop.* 2003; 23: 24-28.
13. Bruner JP, Tulipan NB, Richards WO, Walsh WF, Boehm FH, Vrabcak EK. In utero repair of myelomeningocele: a comparison of endoscopy and hysterotomy. *Fetal Diagn Ther.* 2000; 15: 83-8.

14. Khol T. Percutaneous fetal access and uterine closure for fetoscopic surgery. Lessons learned from 16 consecutive procedures in pregnant sheep. *Surg Endoscop.* 1997; 11: 819-824.
15. Gratacos E, Deprest JA. Effects of amniodistention with carbon dioxide on fetal acid-base status during fetoscopic surgery in a sheep model. *Surg Endoscop.* 2001; 15: 368-72.
16. Maureen D, Edelstein K, Hetherington R, Copeland K, Frederick J, Blaser S, Kramer L, Drake J, Brandt M, Fletcher J. Neurobiology of perceptual and motor timing in children with spina bifida in relation to cerebellar volume. *Brain.* 2004; 127: 1292-1301.
17. Shim I, Ha Yoon, Young J, Lee HJ, Yang K, Chang J. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurg.* 2003; 53: 416-424.
18. Jennigs RW, Wilkinson C, Westerberg B. Chiari malformation develops in surgically created myelomeningocele and its prevented by repair of the myelomeningocele in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 41: 11-13.
19. Peak BW, Farmer DL, Wilkinson CC, Albanese CT, Peacock W, Harrison MR. Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: 1119-23.
20. Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, Walsh DS, Rorke LB, Adzick NS. Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Podiatry Surg.* 2003; 38: 451-8.
21. Encinas Hernández JL, Soto C, García-Cabezas MA, Pederiva F, Garriboli M, Rodríguez R, Peiró JL, Carceller F, López-Santamaría M, Tovar JA. Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease. *Pediatr Surg Int.* 2008; 24: 1335-40.
22. McLone DG. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci.* 1989; 15: 1-12.
23. de Wit O, den Dunnen W, Sollie K, Iris R, Meiners L, Brouwer O, Rodríguez E, Silval D. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with myelomeningocele. *Cer Fluid Res.* 2008; 5: 4.
24. Jimenez AJ, Tome M, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001; 60: 1105-119.
25. Rodríguez EM. The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. Review. *J Endocrinol.* 1976; 71: 407-4.