

2016
Dolores Domínguez Pinos
2016
TESIS DOCTORAL



Tesis Doctoral:

Procesos Neuropatológicos Comunes Asociados a las Paredes Ventriculares en la Hidrocefalia Congénita Humana

Dña. Dolores Domínguez Pinos

Directores:

Dr. José Manuel Fernández-Fígares

Dr. Antonio Jesús Jiménez Lara

Programa de Doctorado:

Neurociencia y sus Aplicaciones Clínicas (2002 – 2004)

Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DPTO. BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

Memoria de Tesis Doctoral

**PROCESOS NEUROPATOLÓGICOS
COMUNES ASOCIADOS A LAS PAREDES
VENTRICULARES EN LA HIDROCEFALIA
CONGÉNITA HUMANA**

Dolores Domínguez Pinos

Málaga 2016



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Dolores Dominguez Pinos

 <http://orcid.org/0000-0002-7429-4975>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DPTO. BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

Memoria de Tesis Doctoral

**PROCESOS NEUROPATOLÓGICOS
COMUNES ASOCIADOS A LAS PAREDES
VENTRICULARES EN LA HIDROCEFALIA
CONGÉNITA HUMANA**

Autora: Dña. Dolores Domínguez Pinos

Directores: Dr. José Manuel Fernández-Fígares Pérez

Dr. Antonio J. Jiménez Lara

Málaga, 5 de febrero de 2016

**Trabajo de investigación del Programa de Doctorado
Neurociencia y sus aplicaciones clínicas (Bienio 2002-2004)**

**Línea de investigación: Desarrollo del Prosencéfalo.
Tutelado por el Prof. Dr. Anibal Smith**

**Certificado-Diploma de Estudios Avanzados en el Área de
Conocimiento de Anatomía y Embriología Humana.**

Suficiencia investigadora en 2005

Dr. D. José Manuel Fernández-Figares Pérez, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

Dr. D. Antonio Jesús Jiménez Lara, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMAN

Que el Licenciado Dña. Dolores Dominguez Pinos ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "Procesos neuropatológicos comunes asociados a las paredes ventriculares en la hidrocefalia congénita humana"

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga a 6 de noviembre de 2015.

Fd.: Antonio J. Jimenez Lara



Fd.: José Manuel Fernández-Figares Pérez



Yo, Dolores Domínguez Pinos, declaro ser la autora del presente trabajo de investigación realizado en el departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, bajo la dirección del Dr. José Manuel Fernandez-Fígares Pérez y del Dr. Antonio Jesús Jiménez Lara.

Y para que así conste, firmo el presente documento.

En Málaga a 7 de noviembre de 2015

Fdo. Dolores Domínguez Pinos

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- Junta de Andalucía. Consejería de Sanidad 2001-2004. Becaria con cargo a proyecto “Papel del epitelio ependimario en la etiopatogenia de la hidrocefalia” Servicio Andaluz de Salud nº 140.
- Ministerio de Sanidad y Consumo 2001-2003. FIS 01/0948.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Centro en Red de Investigación de Enfermedades Neurológicas. 2003-2005. C03/06.
- Junta de Andalucía. Consejería de Sanidad 2004-2005. 104/2002.
- Ministerio de Sanidad y Consumo 2003-2005. FIS: PI03 0756.
- Ministerio de Sanidad y Consumo 2006-2009. FIS: PI06 0423.
- Junta de Andalucía. Fundación Progreso y Salud 2010-2012. PS09/00376.
- Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM): 2011-2015. Código: 04_MIML_INVESTIGACION_SERAM_2011.
- Ministerio de Sanidad y Consumo 2013-2015. FIS PI12-0631.

Así mismo se encuentran publicadas las siguientes revistas indexadas:

- Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. M. D. Domínguez Pinos, P. Páez, A. J. Jiménez, B. Weil, M. A. Arráez, J. M. Pérez-Fígares, E. M. Rodríguez. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(7): 595-604
- In moderate communicating hydrocephalus of human fetuses, ependymal denudation is a common feature that may result in abnormal neurogenesis. M. D. Domínguez, A. J. Jiménez, P. Páez, B. Weil, M. A. Arráez, E. M. Rodríguez y J. M. Pérez-Fígares. *Cerebrospinal fluid research* 2005; 2(Supp1): S5.
- Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. R. Roales-Buján, P. Páez, M. Guerra, S. Rodríguez, K. Vío, A. Ho-Plagaro, M. García-Bonilla, L. M. Rodríguez-Pérez, M. D. Domínguez-Pinos, E. M. Rodríguez, J. M. Pérez-Fígares, A. J. Jiménez. *Acta Neuropathol*. 2012 Oct; 124(4): 531-46
- A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. E. M. Rodríguez, M. Guerra, K. Vío, C. González, A. Ortloff, L. F. Bátiz, S.

Rodríguez, M. C. Jara, R. I. Muñoz, E. Ortega, J. Jaque, F. Guerra, D. A. Sival, W. F. den Dunnen, A. J. Jiménez, M. D. Domínguez-Pinos, J. M. Pérez-Fígares, J. P. McAllister, C. Johanson. Biol Res. 2012; 45(3): 231-42. Review.

- Increased levels of TNF α but not TGB β 1 are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. A. J: Jiménez, L. M. Rodríguez-Pérez, M. D. Domínguez-Pinos, M. C. Gómez-Roldán, M. García-Bonilla, A. Ho-Plagaro, R. Roales-Buján, S. Jiménez, M. C. Roquero-Mañueco, M. I. Martínez-León, M. L. García-Martín, M. Cifuentes, B. Ros, M. A. Arráez, J. Vitorica, A. Gutiérrez, J. M. Pérez-Fígares. Neurop Neuropathol Appl Neurobiol. 2014 Dec; 40(7): 911-32.
- Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. A. J. Jiménez, M. D. Domínguez-Pinos, M. M. Guerra, P. Fernández-Llebrez, J. M. Pérez-Fígares. Tissue Barriers 2014; 2: e28426.
- Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. M. M: Guerra, R. Henzi, A. Ortloff, N. Lichtin, K. Vío, A. J. Jiménez, M. D. Domínguez-Pinos, C. González, M. C. Jara, F. Hinostroza, S. Rodríguez, M. Jara, E. Ortega, F. Guerra, D. A. Sival, W. F. den Dunnen, J. M. Pérez-Fígares, J. P. McAllister, C. E. Johanson, E. M. Rodríguez. Neuropathol Exp Neurol. 2015 Jul; 74(7): 653-71.

Las siguientes publicaciones a congresos:

- Estudio del epitelio ependimario humano y sus alteraciones en casos de hidrocefalia. Domínguez MD, Páez P, Rodríguez-Pérez LM, Tomé M, Weil B, Jiménez A, Arráez MA, Pérez-Fígares JM. Rev Neurol 2003; 37(12): 1173.
- Expresión de Marcadores Inmunocitoquímicos como indicadores del estado del ependimo no denudado en caso de hidrocefalia congénita humana. MD Domínguez, P Páez, B Weil, AJ Jiménez, MA Arráez, EM Rodríguez, JM Pérez-Fígares. Rev Neurol 2005; 41(Suppl 2): 89.

Los siguientes capítulos de libro:

- Aspectos celulares y moleculares del proceso de estenosis del acueducto de Silvio que conducen al desarrollo de hidrocefalia hereditaria. Rodríguez EM, Wagner C, Bátiz F, Rodríguez S, Vio K, Jiménez AJ, Domínguez MD, Pérez Fígares JM. Referencia: Investigación y Avances en Medicina Neonatal. Ed: López Satre J, Fraga

Bermúdez JM, Coto Cotallo GD y Fernández Colomer B. Universidad de Oviedo. pp 85-106 (2005).

- Congenital hydrocephalus. Imaging for Clinicians. Domínguez Pinos MD y Jiménez-Lara AJ. En: The 100 Cases a Pediatrician Must Be Familiar Edit. Springer. ISBN: 978-3-642-28628-5.
- Premamilar Ventriculostomy. Domínguez Pinos MD y Martínez León MI. En: Learning Pediatric Imaging 100 Essential Cases. Edit. Springer. ISBN: 978-3-642-16891-8.

Los resultados del presente Trabajo de Investigación fueron presentados en los siguientes congresos como comunicaciones tipo póster:

- X Congreso Sociedad Española de Neurociencia, (SENC 2003). Lérida.
- X Congreso Sociedad Española de Biología Celular (2003). Santander.
- IV Forum Europeo de Neurociencia (FENS 2004). Lisboa (Portugal).
- Congreso XI Congreso Sociedad Española de Neurociencia. (SENC 2005). Málaga.
- 4th INMED/TINS Conference celebrado 2005. Marsella (Francia).
- V Reunión de la Red Glial Española 2010. Málaga.
- 49th Annual Meeting. Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida. Barcelona 2005.
- 55th Annual Meeting of Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida. Nottingham. (Inglaterra) 2011.
- 56th Annual Meeting Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida (SRHSB) York (Inglaterra) 2012.
- 57th Annual Meeting Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida (SRHSB) Cologne (Alemania) 2013.
- 58th Annual meeting of the Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida. Uppsala (Suecia) 2014.
- 59th Annual meeting of the Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida. Málaga 2015.

Agradecimientos

Sería imposible en unas líneas agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo durante tantos años. No obstante no quiero perder la ocasión de reflejar a personas que han aportado mucho a mi vida y a este estudio.

Por un lado conocer al José Manuel Fernández-Figares ha sido, sin exagerar, lo mejor que me ha pasado en la vida, ¿quién me iba a decir cuando estaba buscando una forma de estudiar el nervio periférico y su regeneración, que la célula ependimaria iba a cambiarme la vida? Sin olvidar a la persona que nos presentó Pedro Fernández Llebrez. Tengo que agradecer a José Manuel no solo su amistad y su paciencia, sino también la puerta que me abrió al conocimiento científico permitiéndome trabajar con su equipo. Y por supuesto, las aportaciones a mi unidad familiar, ya que allí conocí al que es mi marido, Juan Félix López. Nunca te agradeceré lo suficiente este espacio que me diste en Biología Celular donde tengo grandes amigos (Silvia Hernández, Pilar Arrabal, Ana Fernández, Rick Visser, Leonor Santos, etc). Sin la ayuda de estos amigos esta tesis no habría sido posible, gracias por la generosidad en vuestro tiempo y por vuestra paciencia con esta extraña que no sabía lo que era una pipeta antes de ir a vuestro departamento.

También tengo que agradecerle mucho a Antonio Jiménez, por todo el tiempo que ha dedicado, la gran paciencia que ha tenido, es el director que toda doctoranda quisiera tener.

Y por supuesto a los senior de Biología Celular y Fisiología, Margarita Pérez, Manolo Cifuentes, Antonia Gutiérrez, gracias por vuestra calidad científica y humana, me habéis enseñado mucho.

En esta tesis deben de recibir agradecimientos también los que permitieron la logística del estudio el Hospital Carlos Haya, ahora llamado Hospital Regional de Málaga, y en concreto a Sebastián Luna Jefe del Servicio de Anatomía Patológica, que hizo posible que se estudiaran los casos de archivo del Hospital Materno-Infantil, apostando porque la Universidad y el Hospital pueden ser entornos complementarios donde fluya el conocimiento, gracias por esta visión de futuro que ha permitido progresar en el conocimiento científico. También tengo mucho que agradecer a Bernardo Weil, gran conocedor de la anatomía patológica, que pacientemente revisó casos y acabó creyendo que eso del epéndimo era algo más que un artefacto en las muestras estudiadas por un grupo de universitarios. Por su puesto gracias también a todo el personal técnico de anatomía patológica, que siempre ayudaban con buena cara a solucionar problemas con tinciones, marcajes celulares, localización de muestras, etc.

Otro grupo fundamental y que trabaja día a día con la hidrocefalia es el Equipo de Neurocirugía del Hospital Regional, y a su cabeza Miguel Ángel Arráez, con Bienvenido Ros y otros grandes profesionales que permiten con su trabajo que los pacientes con hidrocefalia tengan una vida mejor, y que a pesar de la sobrecarga de su trabajo clínico, dedican tiempo a conocer los resultados en investigación básica en busca de nuevos abordajes de la enfermedad. Tengo que agradecer al Dr. Manuel Arias y Roberto Nader, que ya no están con nosotros, su participación en los estudios. Especialmente al Dr. Nader con el que pasaba planta

en el año 2001 revisando a los niños ingresados para conocer mejor su evolución e historia clínica.

Dentro de la parte de estudios de LCR hay que agradecer especialmente al Servicio de Laboratorio del Hospital Regional y especialmente al Laboratorio de Urgencias, a Antonio Lillo y Anita Dayaldasani que han colaborado guardando las muestras de LCR para estudio y a Tatiana Díaz del Biobanco Andaluz que nos ha facilitado todos los trámites administrativos para obtener nuevas muestras y conservar las que ya tenemos. Y Marisa González y Maricarmen Muñoz del BIONAND (Centro Andaluz de Nanotecnología y Biomedicina) sin ellas, su paciencia y su bien trabajo, los estudios de HR-MAS no habrían sido posibles.

Por ultimo dentro de este engranaje asistencial, quiero agradecer al Servicio de Radiología del Hospital Regional y en concreto al del Hospital Materno-Infantil sus enseñanzas durante el periodo de residencia; María Martínez, Pascual García-Herrera, Cristina Bravo, Esperanza Vals, Ignacio Alonso y Luisa Ceres, grandes eruditos de la imagen, que realizan un trabajo comprometido con el paciente día a día y con los residentes para que seamos radiólogos bien formados el día de mañana. Especialmente tengo muchos que agradecer a María Martínez, no hemos compartido solo ciencia también una amistad y un deseo de saber insaciable.

Que decir de mis amigos que han estado apoyándome todo este tiempo sin ellos no habría sido posible este trabajo. Gracias Elisa, Andrés, Olga, Irene...

Y a mi familia, gracias mamá, papá y hermanos (Enrique, María del Mar y Alejandra) y familia política (José y Fran) gracias por vuestro apoyo y por estar siempre dispuestos a escuchar.

Y a mi marido, Juan Félix, que ha aguantado mis cambios de humor, mis frustraciones, mis llantos, mis alegrías, mis prisas, mi impaciencia.... Porque lo eres todo para mí. Gracias.

Listado de Abreviaturas

III V: Tercer ventrículo.

IV V: Cuarto ventrículo.

ACV: Accidente Cerebro-Vascular.

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico.

ARFGF2: *ADP Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2*, factor 2 de intercambio de nucleótido guanina de ribosilación del ADP.

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero.

BCA: *Bicinchoninic Acid*, ácido bicinconínico.

BMP4: *Bone Morphogenetic Protein 4*, proteína morfogenética ósea tipo 4.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

CIAC: Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas.

D₂O: Óxido de Deuterio.

DAB: (3-3'-)Diaminobencidina.

DAPI: (4',6-)Diamino (2-)Fenilindol.

DVP: Derivación Ventrículo-peritoneal

E#: día # de desarrollo embrionario.

EAS: Estenosis del Acueducto de Silvio.

ECEMC: Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas.

EEA1: *Early Endosome Antigen 1*, antígeno 1 de endosoma temprano.

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento de fibroblastos básico.

FGF2: *Fibroblast Growth Factor 2*, factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2.

FIV: Fecundación *in vitro*.

FLAIR: *Fluid-Attenuated Inversion Recovery*, recuperación de la inversión atenuada de fluidos (técnica ecográfica).

FLNA: *Filamin A*, filamina A (proteína de unión a actina).

FSE: *Fast Spin-Echo*, eco de espín rápido.

GNDF: *Glial-Derived Neurotrophic Factor*, factor neurotrófico derivado de la glía.

GE: *Gradient-Echo*, eco de gradiente.

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*, proteína ácida fibrilar glial.

HASTE: *Half-Fourier Acquisition Single-Shot Turbo Spin-Echo*, eco de espín turbo y disparo único con adquisición semi-Fourier.

HR-MAS MR: *High Resolution Magic Angle Spinning*, resonancia magnética de alta resolución de espín de ángulo mágico.

H-Tx: *Hydrocephalic Texas rat*, modelo de rata hidrocefálica.

hyh: *hydrocephalus with hop gait*, mutación en roedores que expresa hidrocefalia con marcha a saltos.

Iba-1: *Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1*, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1.

IFN γ : Interferón gamma.

IGF: *Insulin Growth Factor*, factor de crecimiento insulínico.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

IgM: Inmunoglobulina tipo M.

IL8: Interleucina tipo 8.

IVE: Interrupción Voluntaria del Embarazo.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo.

LFA: *Limax Flavus Agglutinin*, aglutinina del *Limax flavus* (babosa amarilla) (tipo de lectina)

Lgl1: *Late-Gestation Lung protein 1*, proteína pulmonar de gestación tardía tipo 1.

LOVA: *Long-standing Overt Ventriculomegaly in Adults*, ventriculomegalia de larga evolución en adultos.

MSI1: *Musashi RNA-Binding Protein 1*, proteína Musashi tipo 1 de unión al ARN.

NGF: *Nerve Growth Factor*, factor de crecimiento nervioso.

NMIIB: *Non-Muscle Myosin IIB*, miosina no muscular tipo IIB.

iNOS: *inducible Nitric Oxide Synthase*, sintasa del óxido nítrico inducible.

OSC: Órgano Subcomisural.

PAP: Peroxidasa-Antiperoxidasa.

PB/ PBS: Tampón Fosfato/ Fosfato Salino.

PIC: Presión Intracraneal.

aPKC λ : atypical Protein Kinase C Isoform, isoforma atípica de la proteína quinasa C.

PNA: *Peanut Agglutinin*, aglutinina del cacahuete (tipo de lectina).

Rac: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate protein*, proteína sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras.

RM: Resonancia Magnética.

SE: *Spin-Echo*, eco de espín.

SG: Semanas de Gestación.

α SNAP: *Soluble N-ethylmaleimide sensitive Factor Attachment Protein alpha*, proteína de unión al factor soluble sensible a N-etilmaleimida, tipo alfa.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SSFSE: *Single-Shot Fast Spin-Echo*, eco de espín rápido y disparo único.

SVH: Síndrome del Ventrículo en Hendidura.

TAC/ TC: Tomografía Axial Computerizada.

TCT: Tris-Carragenina-Tritón (diluyente).

TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*, factor de crecimiento transformante beta.

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa.

TNF α R: *Tumor Necrosis Factor alpha Receptor*, Receptor para TNF α .

TSE: *Turbo Spin-Echo*, eco de espín turbo.

TSP: ácido (3-)Trimetilsilil Propiónico(-2,2,3,3-d₄).

VA: Ventrículoatrial.

VL: Ventrículo Lateral.

VP: Ventrículooperitoneal.

ZSV: Zona Subventricular.

ZV: Zona Ventricular.

Índice

1. Resumen.....	27
2. Introducción	31
2.1 Papel del neuroepitelio en el desarrollo del Sistema Nervioso Central.....	33
2.2 Células implicadas en el desarrollo cortical	40
2.3 El epéndimo maduro	43
2.4 Producción y circulación del líquido cefalorraquídeo	44
2.5 Definición y tipos de hidrocefalia	47
2.6 Epidemiología de la hidrocefalia	49
2.7 Hidrocefalia desde la clínica	51
2.8 Estudios de imagen en la hidrocefalia.....	56
2.9 Marcadores metabólicos en el líquido cefalorraquídeo	60
2.10 Tratamientos en la hidrocefalia y sus complicaciones.....	61
2.10.1 Ventriculocisternostomía bajo control endoscópico	62
2.10.2 La derivación externa del LCR	64
2.10.3 Las derivaciones internas	64
3. Objetivos e hipótesis	67
4. Materiales y métodos.....	71
4.1 Necropsias de fetos	73
4.2 Técnicas inmunohistoquímicas	76
4.2.1 Anticuerpos estudiados.....	78
4.2.2 Técnicas histoquímicas.....	80
4.3 Técnicas de inmunofluorescencia	81
4.4 Muestras del líquido cefalorraquídeo humano.....	83
4.5 Metabolómica del líquido cefalorraquídeo.....	86
4.6 ELISA para TNF α en líquido cefalorraquídeo.....	87
4.7 Estudios de imagen de casos hidrocefálicos	88
5. Resultados	91
5.1 El epéndimo de fetos humanos controles.....	93
5.2 Alteraciones patológicas en las paredes ventriculares	100
5.3 Rosetas ependimarias	101

5.4	Características de la barrera astrogial en las zonas sin epéndimo.....	116
5.5	Expresión de moléculas de adhesión	123
5.6	Alteraciones de la neurogénesis en la hidrocefalia: heterotopías.....	127
5.7	Análisis del LCR de casos con diferentes tipos de hidrocefalia: niveles de TNF α	131
5.8	Análisis metabolómico del LCR de casos con diferentes tipos de hidrocefalia	133
5.9	Correlación radiopatológica en un caso humano	135
5.10	Casos clínicos humanos: correlación entre imagen radiológica y resultados en estudio de LCR.....	140
5.10.1	Caso 1. Femenino con estenosis de acueducto de Silvio	140
5.10.2	Caso 2. Varón con estenosis de acueducto de Silvio.....	146
5.10.3	Caso 3. Masculino de hidrocefalia por mielomeningocele	151
5.10.4	Caso 4. Femenino de hidrocefalia poshemorrágica y mielomeningocele	156
6.	Discusión	163
6.1	Estado del epéndimo en los casos normales e hidrocefálicos	165
6.2	Pérdida del epéndimo en fetos con hidrocefalia comunicante	166
6.3	Defectos en el desarrollo del epéndimo pueden relacionarse con la hidrocefalia humana.....	167
6.4	Rosetas endimarias	168
6.5	Consecuencias de la desaparición del epéndimo en la evolución de la hidrocefalia.....	169
6.6	Papel de las reacciones gliales en la hidrocefalia.....	170
6.7	Papel que puede desempeñar la reacción astrocitaria en la hidrocefalia	171
6.8	Astroцитos reactivos y producción de TNF α	174
6.9	Papel de la alteración de las moléculas de adhesión en la hidrocefalia	178
6.9.1	Mecanismos implicados en la interrupción de la zona ventricular.....	179
6.9.2	La interrupción de la zona ventricular del acueducto.....	180
6.10	Alteraciones de la neurogénesis en la hidrocefalia.....	181
6.10.1	Relación de la alteración en la ZV con defectos en el desarrollo cortical	182
6.11	Traslación de los resultados histopatológicos a otros tipos de análisis.....	183

Conclusiones.....	189
8. Bibliografía	191
9. Anexos.....	215
10. Publicaciones.....	225
10.1 Ependymal denudation and alterations of the subventricular zona occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ, Weil B, Arráez MA, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> 2005; 64(7): 595-604.....	225
10.2 Aspectos Celulares y Moleculares del proceso de Estenosis del Acueducto de Silvio que conduce al desarrollo de Hidrocefalia Hereditaria. EM Rodríguez, C Wagner, F Bátiz, S Rodríguez, K, Vio, AJ Jiménez, MD Domínguez, JM Pérez-Fígares. <i>Investigación y Avances en Medicina Neonatal</i> . Editorial: Universidad de Oviedo. DL AS-1.864-05.....	225
10.3 Premamilar Ventriculostomy. Dolores Domínguez Pinos y María I. Martínez León. <i>Learning Pediatric Imaging 100 Essential Cases</i> . Edit. Springer. ISBN: 978-3-642-16891-8.	225
10.4 Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ. <i>Acta Neuropathol</i> . 2012 Oct; 124(4): 531-46	225
10.5 A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. Rodríguez EM, Guerra MM, Vío K, González C, Ortloff A, Bátiz LF, Rodríguez S, Jara MC, Muñoz RI, Ortega E, Jaque J, Guerra F, Sival DA, den Dunnen WF, Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Pérez-Fígares JM, McAllister JP, Johanson C. <i>Biol Res</i> . 2012; 45(3): 231-42. Review.....	225
10.6 Congenital hydrocephalus. Imaging for Clinicians. Dolores Domínguez Pinos y Antonio J Jiménez-Lara. <i>The 100 Cases a Pediatrician Must Be Familiar With</i> . ISBN 978-3-642-28628-5.....	225
10.7 Increased levels of TNF α but not TGB β 1 are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. Jiménez AJ, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Gómez-Roldán MC, García-Bonilla M, Ho-Plagaro A, Roales-Buján R, Jiménez S, Roquero-Mañueco MC, Martínez-León MI, García-Martín ML, Cifuentes M, Ros B, Arráez MA, Vitorica J, Gutiérrez A, Pérez-Fígares JM. <i>Neuropathol Appl Neurobiol</i> . 2014 Dec; 40(7): 911-32.	225
10.8 Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. Antonio J Jiménez, María-Dolores Domínguez-Pinos, María M Guerra, Pedro Fernández-Llebrez, José-Manuel Pérez-Fígares (2014), <i>Tissue Barriers</i> , 2014 Mar 19;2:e28426. doi: 10.4161/tisb.28426. eCollection 2014. Review.	225

10.9 Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. Guerra MM, Henzi R, Ortloff A, Lichtin N, Vío K, Jiménez AJ, Dominguez-Pinos MD, González C, Jara MC, Hinostroza F, Rodríguez S, Jara M, Ortega E, Guerra F, Sival DA, den Dunnen WF, Pérez-Fígares JM, McAllister JP, Johanson CE, Rodríguez EM. J Neuropathol Exp Neurol. 2015 Jul; 74(7): 653-71. 226

1. Resumen

1. Resumen

Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) el tubo neural contiene un neuroepitelio del que se originan la mayoría de sus células. Ese neuroepitelio actúa como un epitelio germinativo donde se encuentran las células madre neurales. En un momento del desarrollo, en el neuroepitelio aparecen las células de la glía radial, que son células madre originadoras de progenitoras que además guían en su migración. Finalmente la glía radial origina el epéndimo, que contiene células diferenciadas, en su mayor parte ciliadas, que terminan cubriendo las cavidades que van a formar los ventrículos del SNC. Los ventrículos contienen un fluido denominado líquido cefalorraquídeo (LCR), el cual fluye a través de las cavidades ventriculares y finalmente llega a las meninges que cubren el SNC, y se reabsorbe en la circulación sanguínea o linfática. En su circulación a veces tiene que pasar por conductos estrecho como el acueducto de Silvio. El LCR se produce en los plexos coroideos mediante un tipo especializado de epéndimo secretor, y también a partir del parénquima nervioso. El epéndimo multiciliado actúa como una interfase entre el parénquima nervioso y el LCR ventricular.

La hidrocefalia se define hoy en como una distensión activa del sistema ventricular debida a una acumulación neta de LCR. Puede deberse a varias razones, donde se pueden encontrar obstrucciones en las diferentes vías por donde circular el LCR. Una de las regiones es el acueducto de Silvio, siendo ese tipo de hidrocefalia clasificada de tipo obstructiva. Otras hidrocefalias denominadas comunicantes en realidad pueden considerarse que existen obstrucciones en las vías meníngeas. La hidrocefalia puede tener un carácter feno-neonatal por diversas razones, algunas ligadas a malformaciones genéticas y determinados síndromes. Otras veces se ocasiona por hemorragias ventriculares en el periodo fetal. Estas finalmente, se transforman en obstructivas. La espina bífida con mielomeningocele, que aparece como un defecto del cierre del tubo neural, frecuentemente se acompaña de hidrocefalia.

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado necropsias de 18 casos con hidrocefalia feto-neonatal diagnosticadas con carácter comunicante, es decir sin obstrucción en el acueducto de Silvio. En el estudio se incluyen algunos casos con mielomeningocele y posthemorrágica. También se han empleado, tomándose como casos controles, necropsias de fetos que no manifestaban neuropatologías. Los casos comprendían edades que oscilaban entre las 12 semanas de gestación, estados gestación pre-término y de tres meses de edad postnatal. En las necropsias se llevó a cabo un estudio de las características histopatológicas presentes, principalmente en las paredes de la corteza cerebral, empleando técnicas generales y de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia. Mediante las segundas se detectaron proteínas marcadoras de diferentes tipos celulares presentes en las paredes. Algunos marcadores se emplearon para obtener una información funcional, como la presencia de canales acuosos, caveolas, endosomas o la producción de la citoquina proinflamatoria TNF α .

Además de las necropsias se han empleado muestras de LCR de casos hidrocefálicos con diferentes tipos de hidrocefalias. En ellas se ha analizado la presencia del factor TNF α . Las

muestras de LCR también se han analizado y mediante espectrometría de protón de hidrógeno con resonancia magnética de alta resolución en ángulo mágico (^1H HR-MAS-RMN). Así se han detectado y cuantificado ciertos metabolitos que pueden ser indicadores de la presencia de condiciones isquémicas y de reacciones gliales.

Finalmente en algunos casos se han podido comparar los datos histopatológicos con la información aportada en el análisis del LCR y de imágenes radiológicas/ecográficas.

En las necropsias de los fetos hidrocefálicos se han encontrado de forma común la existencia de tres aspectos neuropatológicos:

- Ausencia de neuroepitelio/epéndimo, según edad gestacional y tipo de células que se presentan en la zona ventricular. Este denudamiento se encontró ocupando regiones más o menos extensas de la cavidad ventricular. Estas zonas coexisten con otras donde permanece el neuroepitelio/epéndimo.
- Aparición de una reacción astrocitaria que cubre las zonas denudadas de epéndimo.
- Alteración en la distribución de los progenitores neurales/neuroblastos en la pared cortical cerebral en regiones denudadas de epéndimo.

La ausencia de neuroepitelio/epéndimo se puede explicar como un defecto en su desarrollo, al igual que ocurre en modelos animales y se demuestra en modelos experimentales. Previamente a la realización de este estudio, se entendía que su ausencia en la hidrocefalia podía ser debida al estiramiento de la superficie ventricular, ocasionada por la distensión del ventrículo al acumular LCR (ventriculomegalia). La aparición de las rosetas ependimarias en regiones sin epéndimo, encontradas en el presente estudio y en anteriores, puede ser explicada de acuerdo con un defecto anormal del desarrollo del epéndimo. Además, el epéndimo que permanece en los casos con hidrocefalia no muestra una morfología que aparente un estiramiento, tal y como se ha sugerido en estudios previos. En cambio, en la presentes Tesis Doctoral, se ha puesto de manifiesto que el epéndimo cercano a las zonas denudadas muestra una distribución defectuosa e incluso ausencia de moléculas de adhesión del tipo de la N-cadherina, que desempeñan un papel esencial en su estabilidad. Esta evidencia señala que puede existir un problema en su diferenciación que ocasione su pérdida. En coherencia con los resultados observados en los casos humanos, en modelos animales se ha descrito que esta molécula de adhesión puede verse implicada en la desaparición progresiva del epéndimo.

La desaparición del epéndimo se encuentra reemplazada, en los casos hidrocefálicos, por una reacción astrocitaria, que puede tener un carácter beneficioso. Los astrocitos forman una nueva barrera que sustituye el epéndimo ausente. Tales astrocitos expresan, al igual que el epéndimo, pero en una distribución distinta, el canal acuoso acuaporina 4. Su expresión extensa señala que podría desempeñar un papel activo en la interfase LCR-parénquima nervioso, así como en el edema que normalmente acompaña al parénquima nervioso

periventricular. Además, tales astrocitos muestran caveolas y endosomas con una distribución que sugiere un papel en transportes activos y en endocitosis/transcitosis. Finalmente, se ha encontrado que los astrocitos reactivos son una fuente de la citoquina $TNF\alpha$, que puede tener un papel pro-inflamatorio, pero también regulador de la propia reacción.

En relación con la microglía, en las necropsias estudiadas no se ha encontrado en su forma activada, aunque sí acumulada en las regiones denudadas de epéndimo. Por otro lado, la microglía, al igual que la astrogía aparece como una de las fuentes de $TNF\alpha$, aunque en este caso probablemente su papel sea inflamatorio. Por tanto aunque no aparezca en su forma fagocítica activada, es posible que participe en las condiciones patológicas.

La presencia de alteraciones en la corticogénesis, observadas en las necropsias de los casos hidrocefálicos estudiados, puede correlacionarse con defectos en el desarrollo de la glía radial. Tales alteraciones comprenden la presencia de neuroblastos en la superficie ventricular, acumulados alrededor de vasos sanguíneos perivasculares, distribuidos por toda la zona subventricular, y formando heterotopías periventriculares. Estas evidencias, apuntan a que la hidrocefalia feto-neonatal, por afectar el desarrollo del neuroepitelio/glía radial, puede considerarse como una patología del desarrollo que implica a las células madre.

Las muestras del LCR de los casos estudiados apuntan a que en la aparición de complicaciones pueden aparecer niveles elevados de $TNF\alpha$, los cuales pueden ser indicadores de la existencia de condiciones inflamatorias e isquémicas. En muestras del LCR de esos mismos casos, las elevaciones en los niveles de lactato estarían de acuerdo con la existencia de condiciones isquémicas. Además, se ha permitido detectar una elevación de inositol en esas mismas muestras, como prueba de que pueden existir reacciones astrocitarias.

2. Introducción

2.1 Papel del neuroepitelio en el desarrollo del Sistema Nervioso Central

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) se realiza a partir de la placa neural, que forma el tubo neural. Posteriormente sufre constricciones por flexión y expansión para formar las vesículas embrionarias, que constituyen el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. La cavidad original de la placa neural forma los ventrículos embrionarios, que constituyen una serie de cavidades profundas conectadas en el encéfalo, bañadas de líquido cefalorraquídeo (LCR) (Lowery and Sive 2009).

En etapas tardías del desarrollo, el ventrículo de la región prosencefálica presenta una expansión masiva, dividiéndose para formar los ventrículos laterales (VL) y el tercer ventrículo (III ventrículo). En el mesencéfalo, el ventrículo es un fino acueducto (denominado acueducto de Silvio o cerebral) que comunica el tercer y el cuarto ventrículo (IV ventrículo), este último localizado en el rombencéfalo.

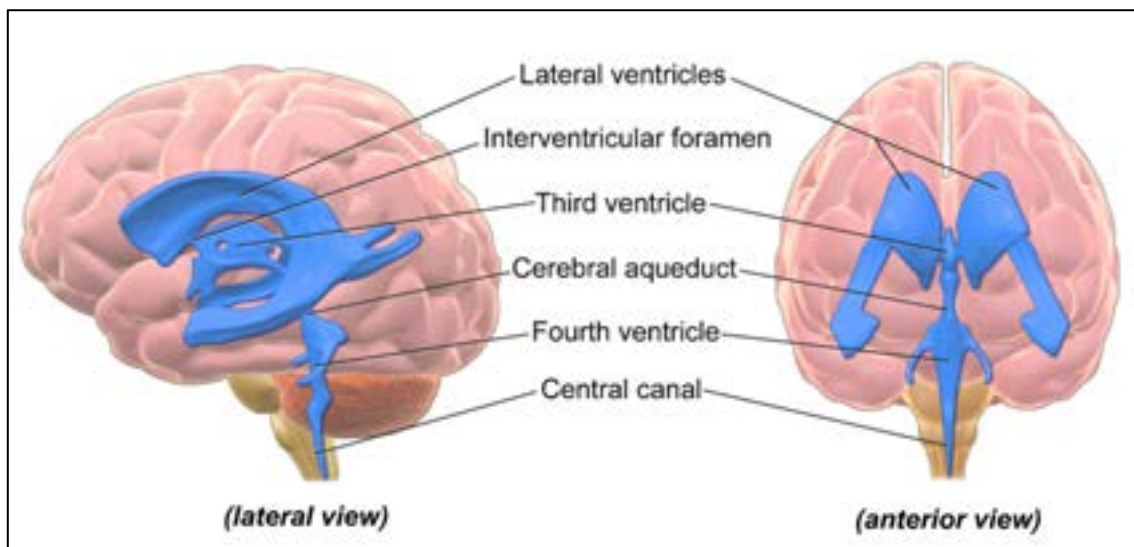


Ilustración 1. Esquema del sistema ventricular en el encéfalo humano (tomado de Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Ventricular_system)

El neuroepitelio y el epéndimo constituyen, respectivamente, dos barreras o interfases entre la luz ventricular y el parénquima nervioso, en el SNC en desarrollo y maduro. Ambas desempeñan una función muy importante en el desarrollo, la morfogénesis y la fisiología del SNC (Bruni, Del Bigio, and Clattenburg 1985; Sarnat 1992; Sarnat 1995; Del Bigio 1995; Bruni 1998; Del Bigio 2010).

Durante el desarrollo del SNC, la zona germinal está formada por un neuroepitelio pseudoestratificado. Las células de la glía radial se originan en el neuroepitelio. La glía radial está formada por células madre que, además, guían la migración neuronal determinando el

destino final de las neuronas y su posición en el SNC en desarrollo (Rakic 2003). Las células de la glía radial presentan una polarización ápico-basal y se extienden desde la luz ventricular hasta la superficie pial, donde presentan su lámina basal. Están unidas a nivel apical por uniones estrechas (*zonula occludens*) y uniones adherentes (*zonula adherens*), y uniones de acoplamiento tipo *gap* en la membrana plasmática lateral (Götz and Huttner 2005; Lehtinen and Walsh 2011). Posiblemente, a través de su cilio apical son capaces de recibir señales del LCR que influyen en su función (Lehtinen and Walsh 2011).

Además de la función germinal detallada en el párrafo anterior, el neuroepitelio está involucrado en la morfogénesis normal del SNC, realizando una oclusión temporal (no permanente en el tiempo) del tubo neural en un momento en el que el neuroporo posterior todavía está abierto y el poro anterior ya está cerrado, permitiendo así la expansión del sistema ventricular y el desarrollo del encéfalo (Gato and Desmond 2009). Esta expansión está inducida por un aumento de la presión intraventricular en un momento en el que los plexos coroideos no están desarrollados y, por tanto, aún no producen LCR. Además, se ha sugerido que el neuroepitelio es el productor del LCR embrionario, determinando su composición química. Los mecanismos celulares subyacentes a la expansión ventricular se han estudiado en embriones de pollo, donde se ha observado que requieren una señalización mediante calmodulina. Este mecanismo es dependiente del calcio extracelular y está mediado por AMPc (adenosin monofosfato cíclico) y puede implicar a la molécula de adhesión N-cadherina (Desmond, Duzy, and Federici 1993). Investigaciones recientes llevadas a cabo en el desarrollo del pez cebra, han arrojado más luz sobre el papel de las células neuroepiteliales en este mecanismo. Así, se ha visto que las uniones estrechas de las células del neuroepitelio contienen claudina del tipo 5A, formando una barrera encéfalo-LCR que permite la expansión de la luz ventricular impulsada por la presión hidrostática (Zhang et al. 2010).

El neuroepitelio transporta activamente iones sodio y secreta proteínas y proteoglicanos hacia la luz ventricular, contribuyendo a aumentar la presión hidrostática intraventricular (Gato and Desmond 2009). Además, el neuroepitelio regula su laxitud, facilitando la expansión de la luz ventricular, a través del control de su contractilidad en la que participa la miosina (Gutzman and Sive 2010). En el pez cebra, se ha demostrado que el latido cardíaco y la circulación arterial contribuyen también a la expansión ventricular (Lowery and Sive 2005).

La presión creada en el ventrículo gracias al papel del neuroepitelio, parece tener un papel importante en la estimulación de la proliferación de las células progenitoras y en la morfogénesis del encéfalo (Gato and Desmond 2009). Esta estimulación podría explicar el aumento de la producción de células endimarias a partir del neuroepitelio, que aparece en algunos ventrículos durante el proceso de ventriculomegalia en la hidrocefalia descrita en el ratón mutante *hyh* (Bátiz et al. 2011).

En el SNC inmaduro, las células neuroepiteliales presentan en sus polos apicales las llamadas uniones en cinturón (*strap junctions*), que se han considerado diferentes a las uniones estrechas. Estas uniones pueden formar una barrera física que restringe el movimiento de moléculas (como las proteínas) (Dziegielewska et al. 1988; Saunders, Habgood,

and Dziegielewska 1999; Ek et al. 2012). Estas uniones en cinturón pueden restringir la entrada de proteínas desde el LCR al fluido intersticial.

Por tanto, la existencia del LCR embrionario con una composición química concreta facilita los procesos morfogénicos y la regionalización del tubo neural durante el desarrollo, y desempeña un papel clave al promover la supervivencia y proliferación de células neuroepiteliales (Martin et al. 2009). Lehtinen y Walsh han revisado recientemente el papel del LCR en la neurogénesis embrionaria a través de la síntesis de factores de crecimiento, supervivencia y diferenciación, tales como la síntesis de insulina y los factores de crecimiento insulínicos (IGF) tipos 1 y 2, el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), la activaciones de genes como *sonic hedgehog*, y la síntesis del ácido retinoico (Lehtinen and Walsh 2011).

Además de las funciones regionales del neuroepitelio que derivan de la presencia de células madre, en algunos lugares las células se especializan en la secreción de las moléculas y los morfógenos que rigen el desarrollo del SNC (Sarnat 1992). Así, en las placas del techo y del suelo se identifican células epiteliales especializadas que actúan como organizadores que guían el desarrollo neuronal, la morfógenesis, y envían moléculas-señal como netrina-1, SLIT, *sonic hedgehog*, y moléculas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Sánchez-Camacho et al. 2005). El análisis ultraestructural de la placa del suelo del mesencéfalo ha revelado la presencia de orgánulos propios de células secretoras, lo que sugiere que el neuroepitelio probablemente participa en la secreción de moléculas hacia el LCR ventricular, aunque las funciones de estas moléculas permanecen sin aclarar (del Brio et al. 2000; del Brio et al. 2001; Richter et al. 2001).

Las células neuroepiteliales y las de la glía radial que derivan de ellas, son consideradas como progenitoras apicales del epitelio germinativo (Paridaen and Huttner 2014). En un momento dado, las células de la glía radial dan lugar a la neurogénesis, pasando de divisiones simétricas a asimétricas, momento en el que una de las células hija inicia su diferenciación, para convertirse en una neurona. En algunas partes de la futura neocorteza, la célula hija puede quedar como un progenitor intermedio. Los progenitores intermedios se dividen principalmente de forma simétrica, originando de esta forma una mayor tasa de neuronas (Paridaen and Huttner 2014) (Ilustraciones 2 y 3). En la corteza cerebral, las primeras neuronas en generarse forman la preplaca, y sus axones junto con los que crecen del tálamo establecen la zona intermedia. Por tanto, la zona intermedia separa la zona ventricular de la preplaca. Las neuronas generadas para formar las capas II-IV constituyen la placa cortical, que divide la preplaca en la zona marginal, o futura capa I, y la subplaca, que es una población transitoria de neuronas que finalmente mueren de forma programada (Zigmond 1999).

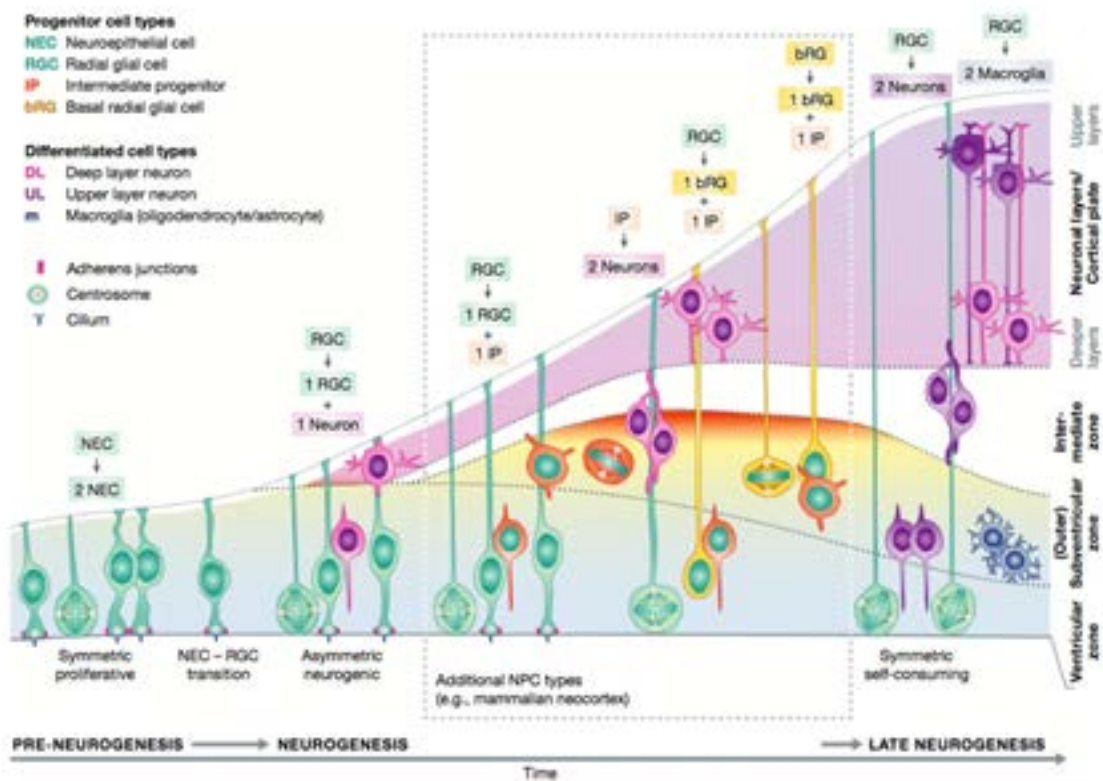


Ilustración 2. Desarrollo cortical. (Extraído de Paridaen and Huttner 2014)

Dentro del proceso de maduración de la corteza cerebral humana se definen 5 estadios (Oi 2011):

- Estadio I (de la semana 8 a la 21 de gestación). Durante el que se producen los fenómenos de proliferación neuronal.
- Estadio II (de la semana 22 a la 31). Durante el que se producen los procesos de diferenciación y migración neuronal.
- Estadio III (de la semana 32 a la 40). Comprende la maduración axonal.
- Estadio IV (de la primera semana de vida a la cuarta semana postnatal). Abarca el proceso de maduración dendrítica.
- Estadio V (de la quinta semana de vida a la cincuenta). Comprende la mielinización.

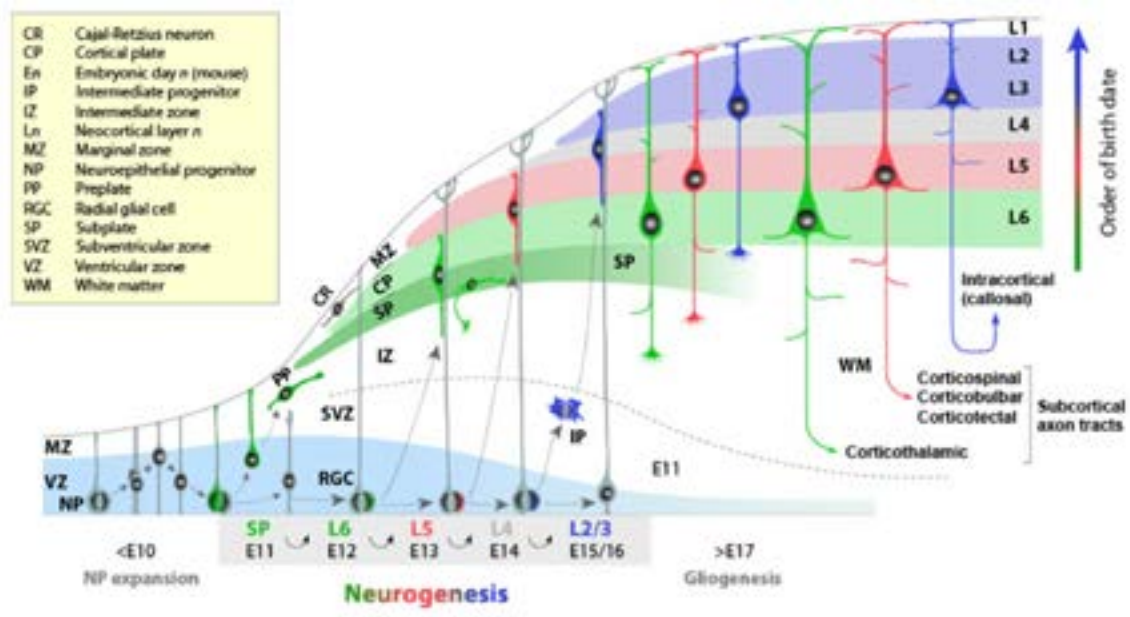


Ilustración 3. Desarrollo cortical. (Extraído de Kwan, Sestan, and Anton 2012)

Casi todas las células del SNC de los mamíferos en desarrollo, se originan en dos zonas germinales estrechamente asociadas, situadas adyacentes a las paredes ventriculares (Jacobson 1991). La zona ventricular (ZV), consistente en el neuroepitelio, y la zona subventricular (ZSV). La ZSV es más prominente en las eminencias ganglionares medial y lateral del cerebro embrionario (Anderson et al. 1999; Wichterle et al. 1999; Parnavelas 2000; Wichterle et al. 2001). La ZSV queda entre la ZV y la zona intermedia. En los ventrículos laterales de animales maduros y de humanos, algunas células madre derivadas del neuroepitelio se conservan entre las células endimarias, constituyendo un nicho neurogénico (Tramontin et al. 2003; Sanai et al. 2011). La asociación íntima entre las células endimarias ciliadas y las células madre de la ZSV ha sugerido al epéndimo como un modulador de poblaciones de células madre. En vacas adultas, las células endimarias mantienen prolongaciones basales en la región anterior de los ventrículos laterales donde las células de la ZSV son más abundantes (Rodríguez-Pérez et al. 2003). Las células endimarias estimulan la neurogénesis en los nichos, ya que secretan Noggin, un antagonista de la proteína morfogenética ósea tipo 4 (BMP4) (Lim et al. 2000). En ratas adultas, la interrupción inducida del epéndimo multiciliado maduro de los ventrículos laterales, en contacto con nichos de células gliales de la zona subventricular, afecta a su actividad neurogénica y gliogénica (Gómez-Roldán et al. 2008). La capacidad limitada de reparación del epéndimo en los VL se ha considerado dependiente de los nichos de células madre en la zona subventricular (Kuo et al. 2006; Luo et al. 2008).

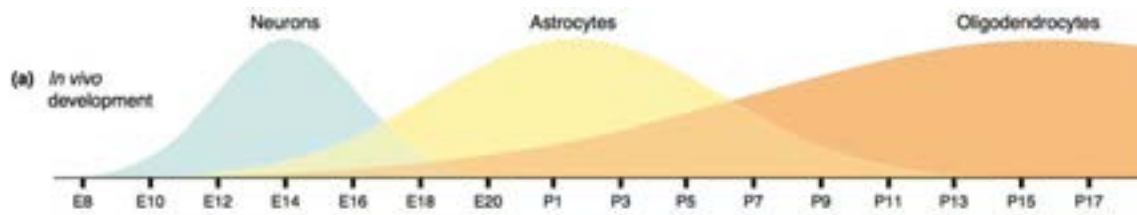
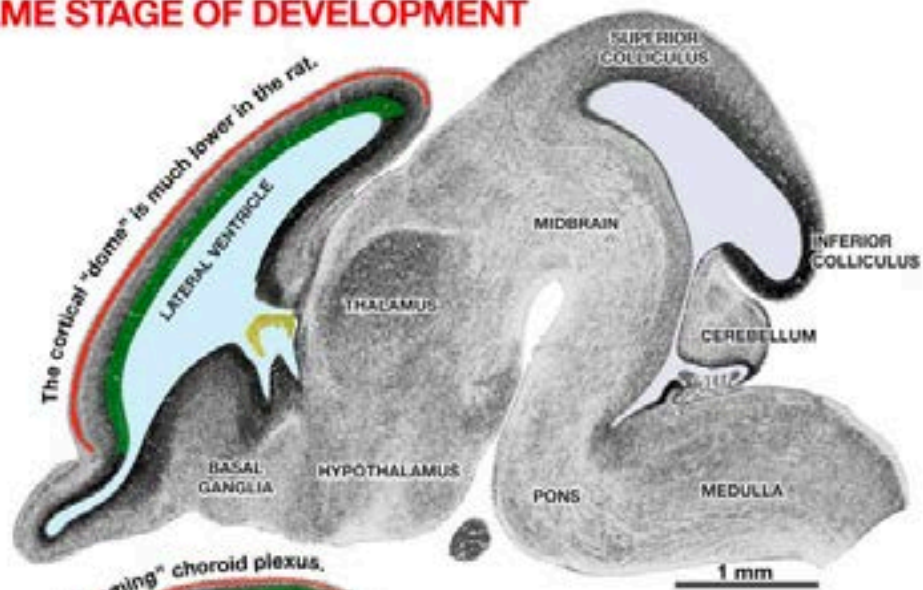


Ilustración 4. Etapas de la neurogénesis y gliogénesis en rata. Representación esquemática de la secuencia que siguen las células progenitoras corticales in vivo. La generación de los tres tipos de células dentro del encéfalo presenta un patrón con solapamiento en el tiempo. En ratas, los picos de neurogénesis ocurren en E14, el de astrocitogénesis en P2, y el de oligodendrocitogénesis en P14. (Extraído de Sauvageot and Stiles 2002)

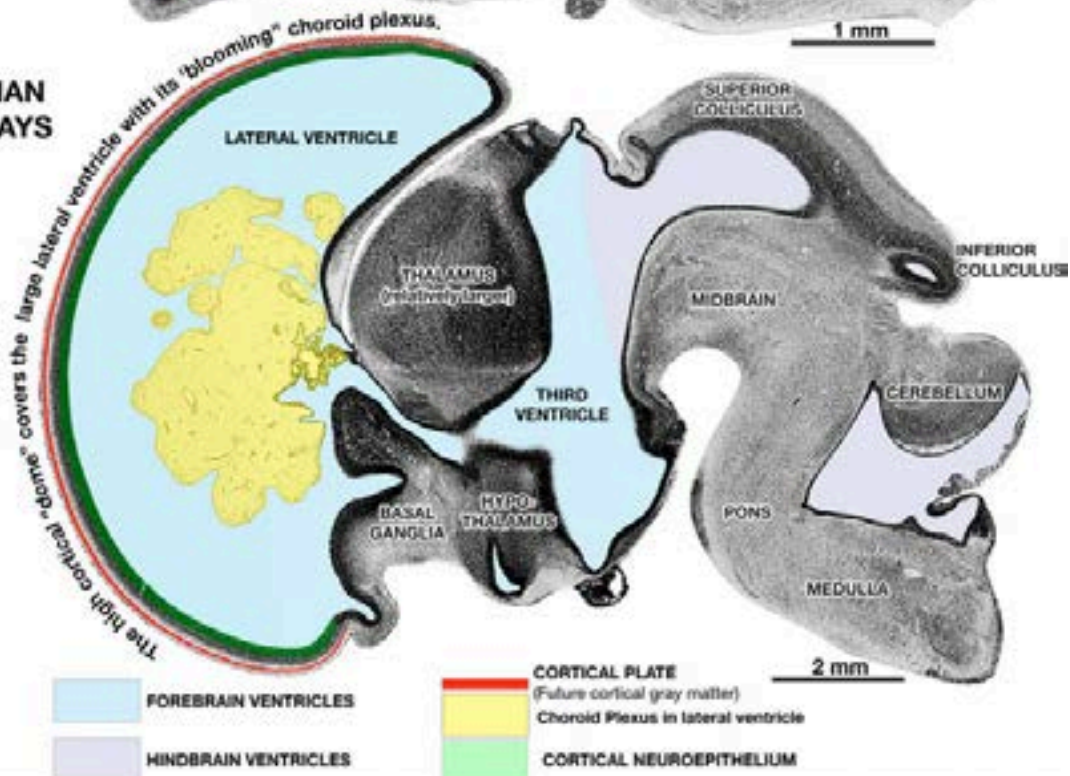
Existe una regulación del destino celular en la formación del SNC que es compleja y que depende de factores intrínsecos y de señales extracelulares de posición (Sauvageot and Stiles 2002). Un factor intrínseco importante es el momento en el tiempo del desarrollo. Así, existen fases que se solapan. Primero se generan las neuronas, seguidas de los astrocitos y luego los oligodendrocitos (Ilustración 4). Aunque esta secuencia es equivalente en el desarrollo de los distintos vertebrados, la escala presenta diferencias (Ilustración 5).

THE BRAINS OF RAT AND HUMAN EMBRYOS AT THE SAME STAGE OF DEVELOPMENT

RAT
18 DAYS



HUMAN
63 DAYS



	FOREBRAIN VENTRICLES		CORTICAL PLATE (Future cortical gray matter)
	HINDBRAIN VENTRICLES		Choroid Plexus in lateral ventricle
			CORTICAL NEUROEPITHELIUM

Ilustración 5. Comparación en los estadios de la maduración neuronal en humano y en ratas. (Extraído de <http://neurondevelopment.org/Human-Rat-Comparisons/>)

No obstante, hoy en día persiste un debate sobre si en el epéndimo existen células madre o si tienen capacidad de desdiferenciarse. Así, se ha descrito una subpoblación de células endimarias que son CD133 positivas, lo que puede representar un resto celular quiescente en el encéfalo anterior de mamíferos con capacidad de desdiferenciación hacia

células madre (Pfenninger et al. 2007; Coskun et al. 2008) . No obstante, se considera que no existen marcadores totalmente específicos para diferenciar las células madre de las células endimarias maduras (Morest and Silver 2003), por lo que es difícil estudiar las funciones de cada una de estas poblaciones celulares. A esta dificultad se añade la íntima asociación entre células endimarias ciliadas y las células madre presentes en nichos neurogénicos de la ZSV de los ventrículos laterales, ya que las últimas emiten prolongaciones celulares entre las células endimarias que hacen difícil la separación física absoluta (Doetsch 2003).

2.2 Células implicadas en el desarrollo cortical

2.2.1. Células madre neurales

Según la etapa del desarrollo cerebral, la ZV puede estar tapizada secuencialmente por células fenotípicamente diferentes: células neuroepiteliales, células de la glía radial y endimocitos (Tramontin et al. 2003)

2.2.1.1 Células neuroepiteliales. Es un epitelio con aspecto pseudoestratificado que contiene células neuroepiteliales altamente proliferativas, que poseen prolongaciones que contactan tanto la superficie apical (ventricular) como la superficie basal (pial) del tubo neural. Las células neuroepiteliales en estadios tempranos del desarrollo se dividen simétricamente para generar más células del mismo tipo. A medida que proliferan, sus núcleos cambian de localización a lo largo del eje ápico-basal, reflejando la etapa del ciclo celular en la que se encuentran: con el núcleo migrando hacia la zona basal durante la fase G1, permaneciendo en la base durante la fase S y luego migran de regreso hacia la zona apical durante la fase G2. Este movimiento, es conocido como migración nuclear intercinética (Götz and Huttner 2005).

2.2.1.2 Glía radial. Hasta hace poco más de dos décadas, se decía que la glía radial servía solo de andamiaje para dirigir la migración neuronal. Sin embargo, este concepto comenzó a ser desafiado cuando se evidenció la proliferación de la glía radial (Misson et al. 1988). En la actualidad, está ampliamente demostrado que la glía radial no sólo es el soporte para la migración de neuronas postmitóticas desde la ZV hasta su ubicación final, sino que también representa la principal población de células madre neurales durante el proceso neurogligénico del desarrollo del SNC (Malatesta et al. 2003; Götz and Huttner 2005; Malatesta, Appolloni, and Calzolari 2008). La proliferación de la glía radial puede seguir dos vías principales: la vía directa, con la de la generación inmediata de neuronas, o la indirecta que puede pasar por uno o múltiples estadios de amplificación (progenitores intermedios) (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). La autotrenovación de la glía radial puede ocurrir por división celular simétrica, generando dos células hijas iguales, o por divisiones celulares asimétricas, generando una célula hija que es idéntica a la madre y una segunda de diferente tipo celular, tal como un progenitor intermedio o una neurona (Götz and Huttner 2005). La identificación de células madre neurales y progenitores intermedios es crítica para el

entendimiento del desarrollo del SNC, la neurogénesis del adulto y para el desarrollo de nuevas estrategias para reparar sus daños (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Glía radial apical. Con el inicio de la neurogénesis, las células del neuroepitelio comienzan a definirse como células de la glía radial apical, perdiendo ciertas características de epitelio. De forma notable, desaparecen las uniones estrechas, aunque se conservan las proteínas asociadas a las uniones adherentes. Estas uniones son críticas para mantener la integridad de la ZV y el funcionamiento de las células madre neurales (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Además persiste una fuerte polaridad apico-basal manteniéndose el contacto, tanto con la zona ventricular como con la superficie basal. Estas células además, además, de dividirse de diferentes formas, pueden llevar a cabo divisiones proliferativas simétricas (produciendo dos células de la glía radial), pueden producir divisiones neurogénicas asimétricas (donde se genera una célula de la glía radial y una neurona) y finalmente puede producir divisiones proliferativas asimétricas (donde se genera una célula de la glía radial y otra célula progenitora, principalmente progenitora intermedia) (Götz and Huttner 2005; De Juan Romero and Borrell 2015).

Glía radial basal. En el humano y en otros mamíferos girencefálicos, se ha demostrado la presencia de una glía radial cuyo soma se encuentra en la ZSV. Debido a la ausencia de vinculación con la zona apical se la ha denominado glía radial basal (Fietz et al. 2010; Hansen et al. 2010; Reillo et al. 2011; De Juan Romero and Borrell 2015). Estas células comparten muchas características con las células de la glía radial apical, como la expresión de vimentina, o la presencia de un proceso basal radial que contacta con la placa cortical. Sin embargo, no presentan prolongación apical y por lo tanto no recibe señales directas del LCR. Estas células son, en mayor medida, responsables de la producción de neuronas (Fietz et al. 2010; Hansen et al. 2010; Reillo et al. 2011; De Juan Romero and Borrell 2015). Es importante destacar que estas células prácticamente son inexistentes en los roedores, ya que estos presentan una zona subventricular mucho más simple. En el humano la zona subventricular se encuentra dividida en zona subventricular externa e interna, y se ha sugerido que la glía radial basal es fundamental para la migración neuronal en mamíferos girencefálicos (De Juan Romero and Borrell 2015).

La fase de glía radial desempeña un papel fundamental en el desarrollo del SNC ya que, no solo está comprometido con un linaje glial, sino que sirven como progenitores neurales y, además, proporcionan el andamiaje por el cual migran los neuroblastos (Rakic 2007; Rowitch and Kriegstein 2010). Tras el cese de la neurogénesis durante la mitad de la gestación, la glía radial pasa a ser gliogénica y da lugar a la proliferación de precursores de astrocitos y oligodendrocitos.

Es importante aclarar que los astrocitos en diferentes etapas del desarrollo embrionario y postnatal son morfológicamente muy diferentes, y probablemente también lo sean funcionalmente. Se ha especulado que la astrogénesis progresa siguiendo, al menos, cuatro etapas: una fase de glía radial proliferativa, una etapa de progenitores intermedios, otra de astrocitos inmaduros, y la de astrocitos adultos. Sin embargo, esto no puede ser más que

una especulación, ya que a día de hoy prácticamente no existen marcadores de progenitores gliales (Molofsky et al. 2012).

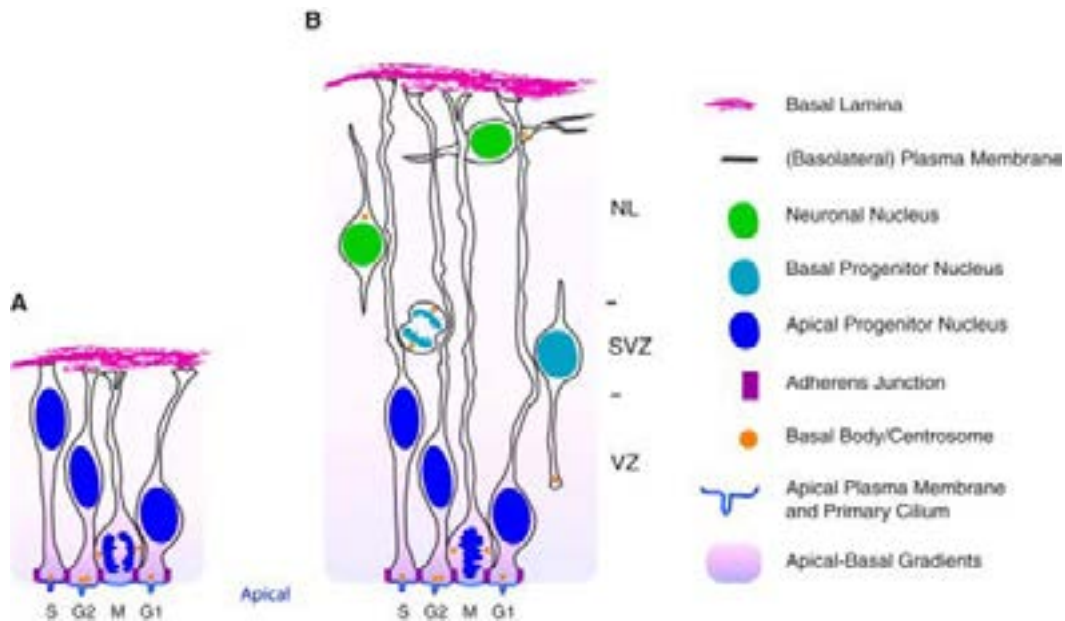


Ilustración 6. Células neuroepiteliales mostrando el movimiento nuclear intercinético (tomado de Tavema and Huttner 2010). Movimiento nuclear intercinético y la polaridad ápico-basal del neuroepitelio (A) y las células de la glía radial (B). Exhiben polaridad apical-basal, con (i) la membrana plasmática apical que recubre la luz del tubo neural, (ii) el cilio primario que sobresale de la membrana plasmática apical, (iii) los centrosomas en interfase (incluyendo el cuerpo basal) situado en el membrana plasmática apical, (iv) uniones adherentes en el extremo más apical de la membrana plasmática basal-lateral, y (v) la membrana plasmática basal en contacto con la lámina basal. Los núcleos ocupan diferentes posiciones a lo largo del eje apical-basal dependiendo de la fase del ciclo celular. Las mitosis (M) se producen en la superficie apical, mientras que la fase S (replicación del ADN) se lleva a cabo en un lugar más basal, con la migración nuclear-apical-basal en G1 y basal-apical a la migración nuclear en G2. Las células gliales radiales (B), muestran un movimiento nuclear intercinético que se limita a la porción de la célula que reside en la zona ventricular (VZ) y la zona subventricular (SVZ), y no se extiende a las capas neuronales (NL).

2.2.1.3 Progenitores intermedios. Estas células están localizadas entre la capa de células de la glía apical y la basal. Son células progenitoras no epiteliales con morfología multipolar. Se generan en la zona ventricular por mediación de una división proliferativa asimétrica de la célula de la glía radial apical y luego migran basalmente hasta colocarse en la segunda capa germinal que es la ZSV (Attardo et al. 2008). Una vez aquí estas células principalmente producirán divisiones neurogénicas simétricas.

2.2.2. Epéndimo

A medida que el SNC se desarrolla, una subpoblación de células madres gliales se compromete con el linaje endimario y ocupan progresivamente la ZV hasta adquirir las características de epéndimo maduro (Spassky et al., 2005). Las células endimarias maduras que recubren las cavidades ventriculares carecen de uniones estrechas y de prolongaciones

basales, aunque si poseen uniones adherentes y en hendidura, constituyendo una barrera entre el parénquima cerebral y el LCR. Su superficie apical posee microvellosidades y abundantes cilios (Brightman and Palay 1963).

2.3 El epéndimo maduro

Durante el desarrollo, una subpoblación de células de la glía radial en el neuroepitelio o ZV produce las células endimarias, que se convertirán en células diferenciadas que son incapaces de proliferar en condiciones normales en roedores y humanos. El proceso de diferenciación de las células endimarias sigue un preciso patrón espacio-temporal en todo el sistema ventricular (Bruni, Del Bigio, and Clattenburg 1985; Sarnat 1992; Sarnat 1995; Bruni 1998). El gen *homeobox Six3* controla la maduración tardía del epéndimo durante el desarrollo tardío, encargándose de suprimir las propiedades de las células de la glía radial (Lavado and Oliver 2011). En humanos, el revestimiento endimario se completa aproximadamente 26-28SG (Del Bigio 2010). Los tanicitos han sido considerados como una forma celular de transición durante el desarrollo y en el SNC maduro tienen funciones distintas de las células endimarias comunes (Bruni 1998).

El epéndimo completamente desarrollado aparece como un epitelio ciliado monoestratificado que recubre la superficie ventricular del SNC, que se extiende desde los ventrículos laterales hasta el *filum terminale*, formando la ZV (Bystron, Blakemore, and Rakic 2008). Queda por tanto constituyendo una barrera o interfase que separa el LCR ventricular del parénquima nervioso, y está implicada en el flujo de sustancias en ambos lados.

Las células endimarias maduras son células poligonales, cúbicas altas o bajas, dependiendo de la ubicación del ventrículo, y están polarizadas en su organización estructural y funcional. Presentan un núcleo redondeado, con un patrón de cromatina punteada y un nucléolo poco visible. En el polo basal, contrario al lumen ventricular, las células endimarias presentan una lámina basal que forma estructuras laberínticas, y que se corresponden a restos de lámina basal de los capilares embrionarios. Su polo apical, luminal, está en contacto con el LCR ventricular y presenta microvellosidades y un promedio de 16 cilios móviles (con axonema del tipo 9+2) por célula, con una longitud aproximada de 1 μ m (Brightman and Palay 1963; Nelson and Wright 1974). Las células endimarias maduras de los mamíferos poseen la estructura y las características enzimáticas necesarias para la eliminación de residuos y desintoxicar una amplia variedad de sustancias en el LCR, y el potencial de formar una barrera metabólica entre el LCR y el SNC. La presencia de cilios móviles, microvellosidades, y de uniones tipo zónula adherente en las superficies apicales es de importancia para estas funciones. Además, la existencia en sus membranas plasmáticas laterales de uniones intercelulares del tipo *gap* se considera como un posible medio para coordinar su actividad celular (Del Bigio 1995; Del Bigio 2002). Estas células endimarias descritas se citarán en adelante como células endimarias multiciliadas para diferenciarlas de otras células

ependimarias especializadas, tales como los tanicitos, que son células monociliadas, y las células epiteliales del plexo coroideo, que también presentan cilios.

Las células ependimarias se han considerado postmitóticas y con una diferenciación terminal (Spassky et al. 2005). Por tanto, el endimio presenta la particularidad, respecto al resto de los epitelios, de que sus células una vez diferenciadas pierden su capacidad proliferativa y no se regeneran, por lo que ante daños o alteraciones genéticas como ocurren en la hidrocefalia no pueden ser sustituidas (Sarnat 1995). No obstante, en el canal central de la médula espinal de vertebrados inferiores, la reparación de la médula espinal es posible (Del Bigio 2010). En algunos casos, como en la hidrocefalia, la ausencia de epéndimo se asocia a la presencia de reacciones astrogliales y de pequeños cúmulos de células ependimarias formando rosetas dentro del parénquima cerebral en las zonas lesionadas (Sarnat 1995).

2.4 Producción y circulación del líquido cefalorraquídeo

El LCR en humanos ocupa un volumen de aproximadamente 140 ml y se renueva totalmente tres veces al día (Davson and Segal 1996), con una tasa media de producción de 500 ml/día (0,35 ml/min) (Thompson 2007).

El movimiento del LCR es fundamental para cumplir correctamente sus funciones principales:

- Mantener flotante el SNC, actuando como colchón o amortiguador térmico y mecánico.
- Servir de vehículo para transportar los nutrientes al SNC y eliminar los desechos.
- Crear una composición molecular extracelular apropiada.
- Transportar mediadores humorales y nutrientes (Johanson et al. 2008).

En el SNC desarrollado, los plexos coroideos producen la mayor parte de LCR. La composición del LCR y del plasma es bastante similar, aunque la concentración de proteínas en el LCR en condiciones normales es más baja. Las células ependimarias altamente especializadas de los plexos coroideos producen el LCR gracias a que poseen la maquinaria apropiada para el transporte iónico y la secreción de diferentes moléculas. Además, existe una fuente extracoroidea que aporta entre el 30-60 % del total del LCR (Rosenberg, Kyner, and Estrada 1980). Este LCR es producido por el intersticio del parénquima encefálico, y alcanza el ventrículo a través de la barrera de las células ependimarias multiciliadas.

Según la teoría de la evolución en la dinámica del LCR, planteada por Oi y Di Rocco (Oi and Di Rocco 2006), existen dos vías de circulación del LCR: la vía menor y la vía mayor. La vía menor, presenta un patrón de producción de LCR predominantemente parenquimatoso,

transependimario. Esta vía menor puede tener un papel fundamental en el desarrollo de la hidrocefalia congénita. La vía mayor, se caracteriza porque el LCR es producido por los plexos coroideos y posteriormente es absorbido en las vellosidades aracnoideas del espacio subaracnoideo.

La circulación del LCR está determinada por su tasa de producción y el movimiento pulsátil de los vasos sanguíneos (Yamada et al. 2008; Wagshul, Eide, and Madsen 2011; Sweetman and Linninger 2011). El movimiento dirigido y coordinado de los cilios de las células endoteliales en el ventrículo también parece contribuir a la circulación del LCR (Nelson and Wright 1974). La circulación del LCR tiene lugar a través de los cuatro ventrículos conectados por vías estrechas. La visión clásica de la circulación del LCR, sostiene que fluye a través de los ventrículos, llega a cisternas (espacios cerrados que sirven de reservorios) en la base del encéfalo, baña la superficie del encéfalo y la médula espinal y, luego, es absorbido en la corriente sanguínea y linfática (Pérez-Figares et al 2001). Las estructuras de paso del LCR a la sangre venosa en humanos son las vellosidades aracnoideas de Pachionni, que se hayan repartidas a lo largo de los grandes senos venosos craneanos. El mecanismo de paso no está totalmente elucidado. En el nacimiento, las vellosidades aracnoideas no están aún maduras, y su maduración marcha paralela a su capacidad de absorción durante los primeros meses de vida. Hoy en día, se cuestiona la relevancia infravalorada de una absorción a través del sistema linfático o de los capilares sanguíneos en el parénquima nervioso (Johnston and Papaiconomou 2002; Chikly and Quaghebeur 2013).

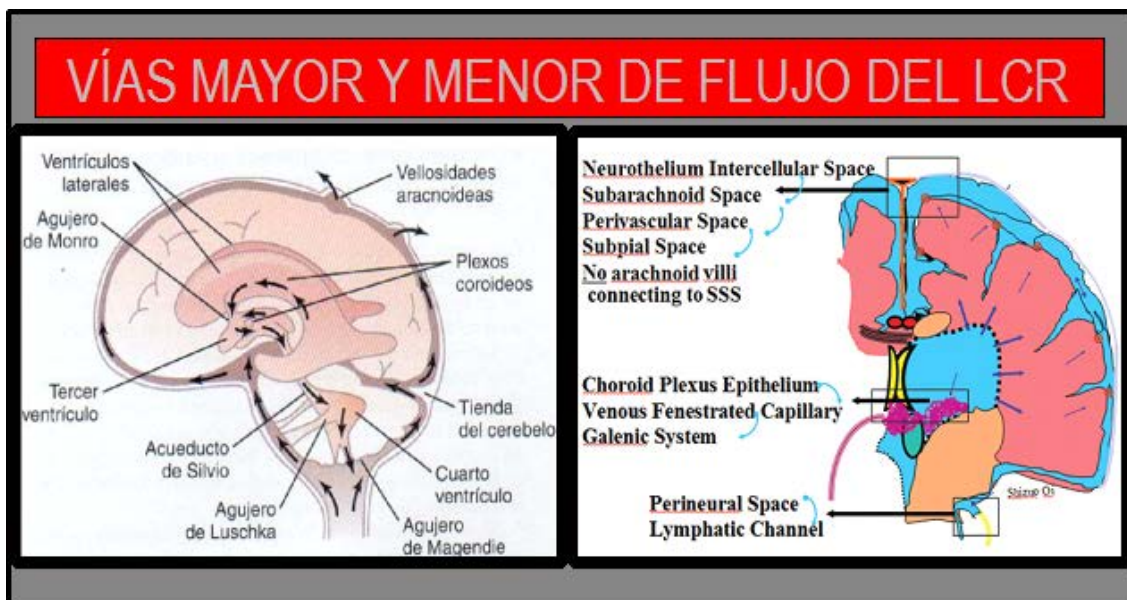


Ilustración 7. Esquema de la vía mayor y menor de circulación de LCR. (Extraído y modificado de Oi and Di Rocco 2006)

La doctrina de Monro-Kellie, dispone que el volumen total de los cuatro componentes intracraneales: tejido nervioso, LCR, sangre arterial y sangre venosa, debe ser constante debido al volumen fijo de la calota y el canal espinal, que no son distensibles. De modo que un aumento de volumen en un componente causa la disminución de volumen equivalente en otro componente, dado que los fluidos son incompresibles. Los tres componentes que influyen la dinámica del LCR son la producción, la circulación y el drenaje. Según esta doctrina, la expansión arterial en el SNC durante cada ciclo cardíaco comprimiría el tejido nervioso a modo de pistón. Esta presión sobre los ventrículos laterales apoyaría el flujo del LCR en su interior.

El equilibrio entre la producción y la absorción de LCR es de vital importancia. En condiciones ideales, el líquido es casi totalmente absorbido en la corriente sanguínea a medida que circula. Sin embargo, hay circunstancias que, cuando se hallan presentes, impedirán o perturbarán la producción de líquido cerebrospinal o que inhibirán su flujo normal. Los problemas en la correcta circulación del LCR no solamente provocan hidrocefalia, sino que su estancamiento, a causa de las deficiencias en el drenaje de principios activos y de productos del metabolismo, se ha relacionado recientemente con alteraciones en el desarrollo de la corteza cerebral (Miyah, Nabyouni, and Zendah 2003) y demencias seniles (Rubenstein 1998).

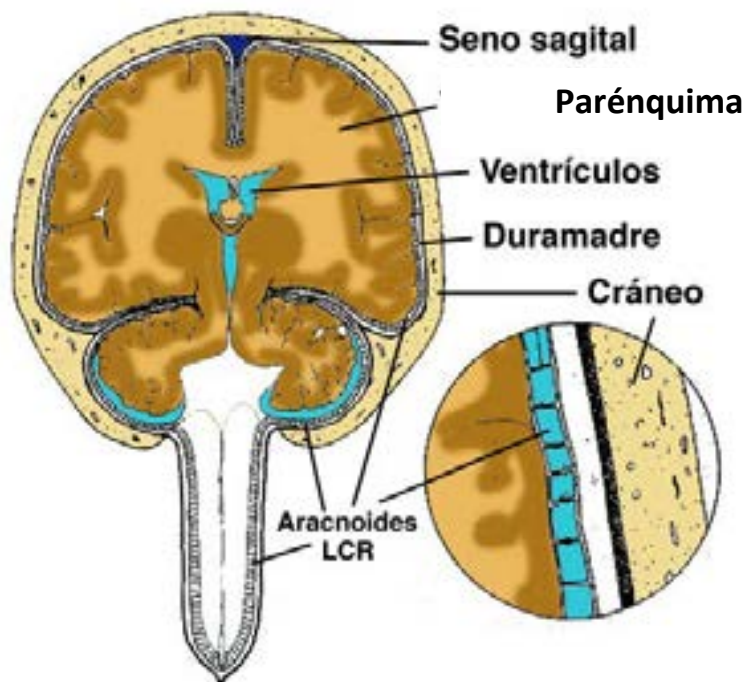


Ilustración 8. Esquema de circulación del LCR por las cisternas y absorción en los senos venosos. (Extraído y modificado de Schmidek, Auer, and Kapp 1985)

La presión intracraneal del LCR (PIC) es definida como la presión hidrostática del LCR. La PIC es la resultante de la secreción activa del LCR y de las resistencias opuestas a la circulación y a la absorción. La PIC es el punto de equilibrio entre la secreción y la absorción y se define con la fórmula: $P=D \cdot R$, donde P= presión de LCR, D=débito, y R= resistencia. El débito de absorción es lineal por encima de una presión inicial, igual a la presión venosa sinusal (5 cm de agua en el adulto en decúbito). En el humano adulto, en reposo y decúbito, la PIC normal basal es de 12 +/- 2 cm de agua, siendo más baja en el periodo neonatal (2 a 4 cm de agua), y estabilizándose a los valores del adulto en la medida en que se osifica el cráneo y se cierran las suturas y fontanelas (Schmidek, Auer, and Kapp 1985).

2.5 Definición y tipos de hidrocefalia

El término hidrocefalia deriva de las palabras griegas "*hidro*", que significa agua, y "*céfalo*", que significa cabeza. Como indica su nombre, es una condición en la que la principal característica es la acumulación excesiva de líquido en el encéfalo. Aunque la hidrocefalia se conocía antiguamente como "*agua en el cerebro*", el "*agua*" es en realidad LCR.

Existen tres mecanismos activos, principales productores de hidrocefalia: el primero, la obstrucción en el flujo del LCR; el segundo, un aumento en la producción del LCR; y un tercero, consistente en una disminución en la absorción del LCR. La hidrocefalia es una condición fisiopatológica compleja, y por ello está sujeta a debate tanto en su definición como en su clasificación definitiva (Rekate 2011).

Se puede destacar una definición temprana que propuso Raimondi (Raimondi 1994) con carácter unificador, donde incluye cualquier aumento del LCR en el compartimento intracraneal, incluyendo el presente en edemas y por atrofia del tejido nervioso como ocurre en las hidrocefalias denominadas *ex vacuo* (ver más adelante). Puesto que esta definición puede contemplar enfermedades no consideradas universalmente desde el punto de vista clínico como hidrocefalias, no ha tenido una completa aceptación. Una definición interesante más reciente es aportada por Oi y Di Rocco (Oi and Di Rocco 2006), ya que tiene en cuenta el estado de desarrollo del SNC y, por tanto, la existencia de una circulación del LCR mayor y otra menor (Ilustración 9).

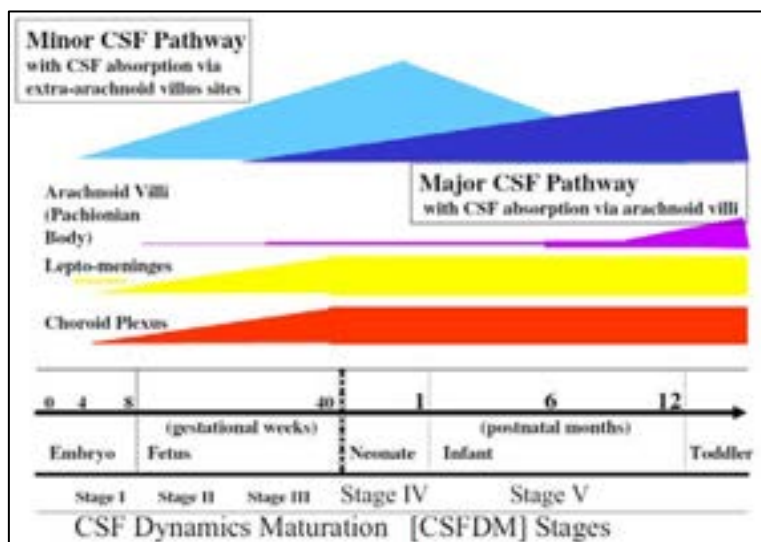


Ilustración 9. Evolución de la circulación del LCR desde la vía menor a la mayor en humanos. Se muestran en relación a los 5 estadios de la maduración de la corteza descritos anteriormente. (Extraído de Oi and Di Rocco 2006)

Rekate ha propuesto, (Rekate 2008), una definición de la hidrocefalia que consiste en una distensión activa del sistema ventricular del SNC, como resultado de una circulación inadecuada del LCR desde su lugar de producción, dentro de los ventrículos, hasta su punto de reabsorción en la circulación sistémica. Por tanto excluiría, por ejemplo, la hidrocefalia *ex vacuo*. Pero lo que tiene de positivo esta definición, es que considera la hidrocefalia como una distensión activa del sistema ventricular, como resultado de una discordancia entre la producción y la absorción del LCR.

Según Dandy y Blackfand (Dandy 1914), las hidrocefalias pueden ser comunicantes o no comunicantes, según exista o no un taponamiento del acueducto de Silvio. El bloqueo de la circulación del LCR entre los ventrículos y el espacio subaracnoideo espinal provocaría la hidrocefalia comunicante.

Russell (Russell 1955) ha clasificado la hidrocefalia en no obstructiva y obstructiva. La hidrocefalia obstructiva consiste en un estrechamiento o cierre en cualquier lugar de la vía del LCR, y la no obstructiva está causada por la sobreproducción de LCR por los plexos coroideos.

Aunque existen muchas definiciones de hidrocefalia, prácticamente todos los autores están de acuerdo en definirla como una patología que se caracteriza por un incremento de LCR en los ventrículos cerebrales. Teniendo en cuenta la definición de Rekate (2008), las hidrocefalias se clasificarían en no obstructivas u obstructivas. En las segundas la obstrucción puede tener lugar en diferentes puntos no sólo del sistema intraventricular (foramen de Monro, acueducto de Silvio), sino que también pueden ser extraventriculares (comunicación del cuarto ventrículo con la cisterna magna, cisternas basales meníngicas, granulaciones aracnoideas y salidas venosas). Las hidrocefalias no obstructivas, debidas a una sobreproducción de LCR por los plexos coroideos son muy raras (papiloma de coroides).

En la hidrocefalia, por tanto, se afecta la dinámica de circulación del LCR. La hidrocefalia puede aparecer tanto en la etapa fetal como adulta, con numerosas variantes y asociada a síndromes. En cuanto a su origen, la hidrocefalia puede ser congénita o adquirida. Entre las congénitas se encuentran las hidrocefalias simples, por digénesis (Dandy-Walker, Chiari, holoprosencefalia, etc.), y las secundarias (por tumores, hemorragias ventriculares, etc.). Un porcentaje no desestimable de los niños que nacen de forma prematura y bajo peso desarrollan hemorragias, de las cuales una proporción importante va a producir hidrocefalia (Bravo et al. 2011). En los casos con defectos del cierre del tubo neural, como el mielomeningocele, la hidrocefalia puede aparecer en hasta un 65 % de los casos (Tamburrini et al. 2013). Aparte de la etiología congénita, la hidrocefalia puede surgir en cualquier momento de la vida por trauma craneal, hemorragia intracraneal, tumor, o envejecimiento, degeneración, e infección del SNC. En cualquiera de los casos, la hidrocefalia se manifiesta con una sintomatología clínica muy similar entre los pacientes, presentando síntomas predominantes de la esfera cognitiva (Da Silva M 2005).

2.6 Epidemiología de la hidrocefalia

La revista científica anual en la que se recogen los principales resultados de la investigación que desarrolla el grupo del ECEMC (Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas) en el CIAC (Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas) (Bermejo Sanchez E 2012), en su último número de 2012, mencionaba el registro, entre 1980 y 2011, de un total de 953 casos de hidrocefalia congénita en España, de los que 172 casos (18,05 %) presentaban hidrocefalia como defecto aislado; en 165 casos (17,31 %), el defecto era secundario a otra alteración primaria del desarrollo (espina bífida en la mayoría de ellos); 384 casos (40,29 %) correspondían a niños poli-malformados, en los que no se pudo reconocer ningún síndrome, y los 232 niños restantes (24,34 %) tenían algún síndrome conocido. (Martinez Frias MI 2012).

En el año 2011 se registraron, en España, un total de 15 casos de hidrocefalia congénita, representando 1,73 casos por cada 10.000 habitantes (0,97-2,85), en los que el 17,31 % fue secundario a la existencia de espina bífida.

Existe una marcada tendencia lineal decreciente en el número de casos estadísticamente significativa (Bermejo Sánchez E 2012) (Ilustración 10).

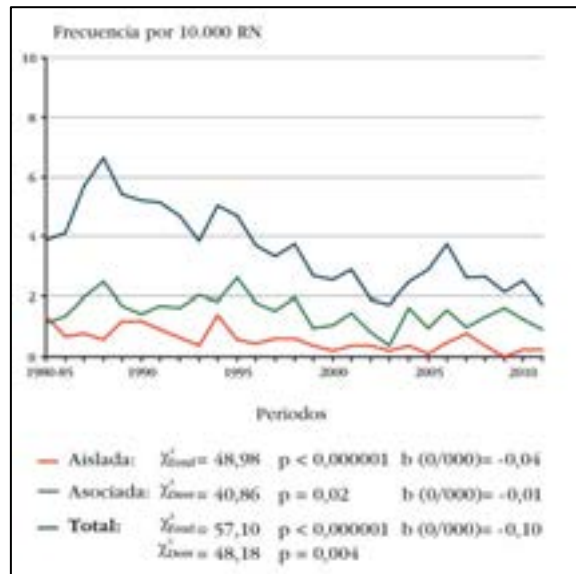


Ilustración 10. Prevalencia de la hidrocefalia congénita en España. (Tomado de Bermejo Sánchez E 2012).

La mejora de los métodos de detección de la hidrocefalia, tanto prenatal como posnatal, ha tenido varias consecuencias sobre su frecuencia. Por una parte, ha aumentado el número de casos en los que se ha podido diagnosticar, y eso incide sobre la frecuencia aumentándola. Por otra parte, si se detectan más casos, también aumenta el número de gestaciones en las que puede plantearse la interrupción voluntaria del embarazo (IVE), y ello produciría un descenso de la frecuencia. Por tanto, la frecuencia de hidrocefalia que se registra en el nacimiento es el resultado del balance entre esas dos influencias opuestas, y como se puede apreciar en la gráfica, hasta 1988 la frecuencia aumentó (es decir, dominó la influencia del diagnóstico de más casos) y, posteriormente, aunque con oscilaciones, la frecuencia ha ido disminuyendo (lo que denota un dominio del impacto de las IVE).

En Andalucía se detectaron un total de 0,97 casos por cada 10.000 recién nacidos en 2011, la cifra más baja de los últimos años, por debajo de la media española de 1,73 casos por cada 10.000 recién nacidos (Ilustración 11).

AUTONOMÍA	Hidrocefalia		
	1980-1985	1986-2010	2011
Andalucía	4,28	2,93	0,97
Aragón	—	3,06	0,00
P. de Asturias	3,89	3,84	8,65
Islas Baleares (a)	4,47	2,80	0,00
Canarias (b)	3,21	5,32	0,00
Cantabria	—	3,05	0,00
Castilla-La Mancha ..	2,64	4,11	2,53
Castilla y León	3,57	4,55	0,96
Cataluña	4,21	3,85	0,00
Com. Valenciana	3,04	2,96	4,63
Extremadura	3,78	2,91	2,10
Galicia	4,50	2,37	0,00 *
La Rioja	3,92	0,94	0,00 *
Com. de Madrid	4,81	3,84	0,00
Región de Murcia	2,66	3,19	0,00
Com. Foral Navarra ..	3,85	3,05	—
País Vasco	4,47	3,43	0,00
Andorra	—	5,01	—
TOTAL	3,87	3,49	1,73
Chi ² (k-1):	4,85	35,53	22,84
p<0,05:	—	+	—

Ilustración 11. Frecuencia por cada 10.000 recién nacido por Comunidades Autónomas en tres periodos de tiempo. El círculo rojo representa la media del porcentaje de los casos de hidrocefalia registrados en España (1,73), la media de casos en Andalucía (0,97) y como extremo la media de casos en el Principado de Asturias (8,65) como comunidad que acumula el mayor número de casos. (Tomado y modificado de Bermejo Sánchez E 2012)

Esta disminución en la incidencia de la hidrocefalia congénita se acompaña de un aumento de las hidrocefalias secundarias o postnatales. De estas últimas, la más frecuente es la hidrocefalia poshemorrágica, cuya prevalencia va en aumento debido tanto a la mayor incidencia de embarazos múltiples y partos prematuros en relación al avance de las nuevas técnicas de fertilización, como a la mayor supervivencia de estos pacientes merced a los recientes avances en los cuidados perinatales (Bravo et al. 2011).

2.7 Hidrocefalia desde la clínica

Desde un punto de vista clínico, en un estadio inicial, la hidrocefalia se identifica por un aumento del tamaño de los ventrículos, lo que se conoce como ventriculomegalia, que suele ser evidente entre las 18SG y 20SG. La detección de una ventriculomegalia obliga a estudios complementarios, incluyendo un segundo análisis ecográfico que confirme el

hallazgo, una resonancia magnética fetal, el cribado de infecciones del grupo TORCH (toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus, herpes simple) o una amniocentesis (Garne et al. 2010). En portadores maternos conocidos de la mutación L1CAM, se debe ofertar la biopsia de vellosidades coriónicas o la amniocentesis para el diagnóstico de hidrocefalia ligada al cromosoma X (Yamasaki et al. 2011). Clínicamente, los bebés con hidrocefalia presentan un crecimiento anormal de la circunferencia cefálica estando por encima del percentil 99 para su edad, irritabilidad, vómitos, abultamiento de la fontanela anterior, o ensanchamiento de las suturas craneales. Se debe realizar un diagnóstico diferencial entre una hidrocefalia verdadera, de lo que se denomina hidrocefalia externa benigna o agrandamiento benigno del espacio subaracnoideo, que no necesita tratamiento y se caracteriza por espacios subaracnoideos agrandados, ventriculomegalia leve o ausente, y un niño clínicamente asintomático (Halevy et al. 2015).

Las causas más frecuentes de la hidrocefalia y sus posibles explicaciones fisiopatológicas se resumen en la siguiente tabla con datos tomados de Kahle (Kahle et al. 2015):

Hidrocefalias adquiridas			
		Causa	Mecanismo propuesto
<i>Inflamatorias</i>	Hemorragia o infección subaracnoidea	Cicatriz aracnoidea	Disfunción del espacio subaracnoideo
	Hemorragia o infección intraventricular	Cicatriz endimaria	Obstrucción ventricular
<i>Neoplasias</i>	Tumores cerebrales parenquimatosos	Efecto masa	Obstrucción ventricular
	Tumores de medula espinal	Alteración en la composición del LCR	Disfunción del espacio subaracnoideo
	Tumores diseminados	Tumores con infiltración meníngea (p.e. tumores primarios neuroectodermicos)	Disfunción del espacio subaracnoideo
	Tumor de plexos coroideos o hiperplasia	Alteración de la composición del LCR Efecto masa Alteración de la función de los plexos coroideos	Disfunción del espacio subaracnoideo Obstrucción ventricular Sobreproducción de LCR o aumento de la dinámica pulsátil intraventricular
<i>Vasculares</i>	Malformaciones vasculares	Obstrucción ventricular (p.e. malformaciones en la vena de Galeno), hipertensión venosa (p.e. en las malformaciones arteriovenosas)	Obstrucción ventricular Disminución de la distensibilidad venosa o disminución de la absorción de LCR
	Desórdenes en la función venosa cerebral	Obstrucción venosa extrínseca (p.e. displasias esqueléticas) Obstrucción venosa intrínseca (p.e. trombosis del seno venoso), disfunción idiopática venosa (p.e. hidrocefalia congénita idiopática)	Disminución de la distensibilidad venosa o disminución de la absorción de LCR

Tabla 1. Causas más frecuentes de la hidrocefalia adquirida

Congénitas o hidrocefalias del desarrollo		
	Causa	Mecanismo propuesto
<i>Estenosis acueductal congénita (estenosis del acueducto de Silvio)</i>	Obstrucción de la salida del III ventrículo	Obstrucción ventricular
<i>Defectos de tubo neural (p.e. mielomeningocele y Malformación de Chiari tipo II)</i>	Obstrucción de la salida del III o IV ventrículo, alteración de la distensibilidad venosa, cicatriz aracnoidea o epndimaria	Variable
<i>Malformaciones de fosa posterior</i>	Obstrucción de la salida del IV ventrículo (p.e. Malformación de Dandy-Walker o Chiari tipo I)	Obstrucción ventricular
<i>Quistes del desarrollo</i>	Efecto masa	Obstrucción ventricular
<i>Atresia congénita del foramen de Monro</i>	Obstrucción a la salida de los ventrículos laterales.	Obstrucción ventricular

Tabla 2. Causas más frecuentes de la hidrocefalia congénita

La hemorragia de la matriz germinal y la hidrocefalia poshemorrágica son las complicaciones neuroquirúrgicas más frecuentes en los pacientes recién nacidos pretérmino (Volpe 1998). La incidencia de estas complicaciones es muy variable según las series consultadas (Papile et al. 1978; Fanaroff et al. 2007; McMennamin, Shackelford, and Volpe 1984; Philip et al. 1989; Sheth 1998; Kuban et al. 1999; Vural et al. 2007), pero su prevalencia está en cualquier caso en aumento debido tanto a la mayor incidencia de embarazos múltiples y partos prematuros en relación al avance de las nuevas técnicas de fertilización, como a la mayor supervivencia de estos pacientes merced a los recientes avances en los cuidados perinatales (Tortorolo et al. 1999).

Más allá de la infancia, la hidrocefalia se presenta típicamente con una constelación de síntomas que incluyen alguna combinación de dolor de cabeza, vómitos, pérdida de los hitos del desarrollo, diplopía (por lo general de una parálisis del nervio craneal VI), o edema de papila, y que lo que reflejan es el aumento de la PIC mantenida (Malagón-Valdez 2006).

Una excepción la constituye la hidrocefalia crónica del adulto, anteriormente llamada normotensiva, en la que los síntomas cardinales son la demencia, la incontinencia urinaria y la apraxia de la marcha y está clasificada como una causa de demencia tratable. Este síndrome fue descrito por Hakim y Adams en 1965 (Hakim and Adams 1965; Adams et al. 1965).

También en el adulto encontramos hidrocefalias benignas o también llamadas *ex vacuo*, en las que lo que predomina es un aumento de los espacios extra-axiales con una dilatación ventricular leve. Se pueden observar en enfermedades como el Alzheimer o la encefalopatía vascular de Binswanger, y no constituyen verdaderas hidrocefalias (Harrison, Isselbacher, and Agud Aparicio 1998). También pueden ocurrir cuando hay daño cerebral, ocasionado por una enfermedad cerebrovascular o una lesión traumática. En estos casos, puede haber una verdadera atrofia o malacia cerebral focal (Sevillano García, Cacabelos Pérez, and Cacho Gutiérrez 2011).

Otra entidad diagnóstica es la ventriculomegalia de larga evolución del adulto o LOVA de sus siglas en inglés *Long-standing Overt Ventriculomegaly in Adults*. En estos pacientes existe un aumento de tamaño ventricular que no siempre está ligado a un aumento de la presión intracraneal. La presencia de ventrículos de un tamaño superior al habitual junto a síntomas que pudieran estar relacionados con un aumento crónico de la PIC (cefalea, alteración de la marcha, incontinencia de esfínteres, deterioro cognitivo) supone un reto diagnóstico para la neurocirugía, pues a menudo ni la clínica ni la radiología son suficientes para indicar una intervención quirúrgica (Horcajadas Almansa et al. 2015). La LOVA se asocia a estenosis del acueducto de Silvio. Descrita inicialmente por Oi (Oi et al. 2000), consiste en grandes aumentos del tamaño ventricular en pruebas de imagen junto a macrocefalia y sintomatología asociada (coeficiente intelectual disminuido, cefalea, demencia, alteración de la marcha, incontinencia, estado vegetativo, mutismo, apatía o parkinsonismo).

2.8 Estudios de imagen en la hidrocefalia

El estudio de imagen del SNC es la prueba diagnóstica más importante ante la sospecha de una hidrocefalia (Harrison, Isselbacher, and Agud Aparicio 1998; Rumack, Wilson, and Charboneau 1999; Siegel 2004; Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005; Malagón-Valdez 2006; Thompson 2007; Bravo et al. 2011; Kahle et al. 2015).

En la clínica, la hidrocefalia congénita se diagnóstica en el periodo prenatal mediante ecografía. En el protocolo de control del embarazo, la primera ecografía se realiza antes de las 12SG para valorar: el número de fetos; su tamaño, que está en relación con la fecha de la última menstruación; y el pliegue nucal, que es un marcador de malformaciones a las 11SG, y debe ser inferior o igual a 2 mm (Rumack, Wilson, and Charboneau 1999).

La segunda ecografía se realiza en torno a las 20SG, y suele ser la que puede detectar la presencia de hidrocefalia. La ventriculomegalia es un signo de hidrocefalia, que se define como un atrio del ventrículo lateral con un tamaño que oscila entre 10-15 mm, midiendo a través del *glomus* del plexo coroideo en corte transversal (Fleischer 2009).

En casos de ventriculomegalia límite, y para detectar alteraciones sutiles, se puede utilizar la resonancia magnética (RM), cuyo uso está aprobado en el segundo y tercer trimestre. Para la RM, en estos casos se usan secuencias cortas potenciadas en T2 en los tres planos del espacio. Se recomienda evitar secuencias T1 largas, ya que pueden aumentar la temperatura fetal. Se evita la exposición de fetos a RM en el primer trimestre, aunque no se ha demostrado que la radiofrecuencia y la exposición fetal a campos magnéticos produzcan malformaciones.

La identificación de espina bífida abierta es posible al comienzo del segundo trimestre, pero exige experiencia y una exploración meticulosa. Existen diversos grados de desplazamiento del vermis cerebeloso, cuarto ventrículo y bulbo raquídeo a través del foramen magno hacia el interior del canal cervical, lo que se denomina malformación de Arnold-Chiari o Chiari tipo II, en los que se identifica una obliteración de la cisterna magna. En estos casos, la cabeza es pequeña y el cerebelo está impactado en la fosa posterior, lo que se denomina “signos de la banana” y los huesos frontales forman el “signo del limón” (Ilustraciones 12 y 13).

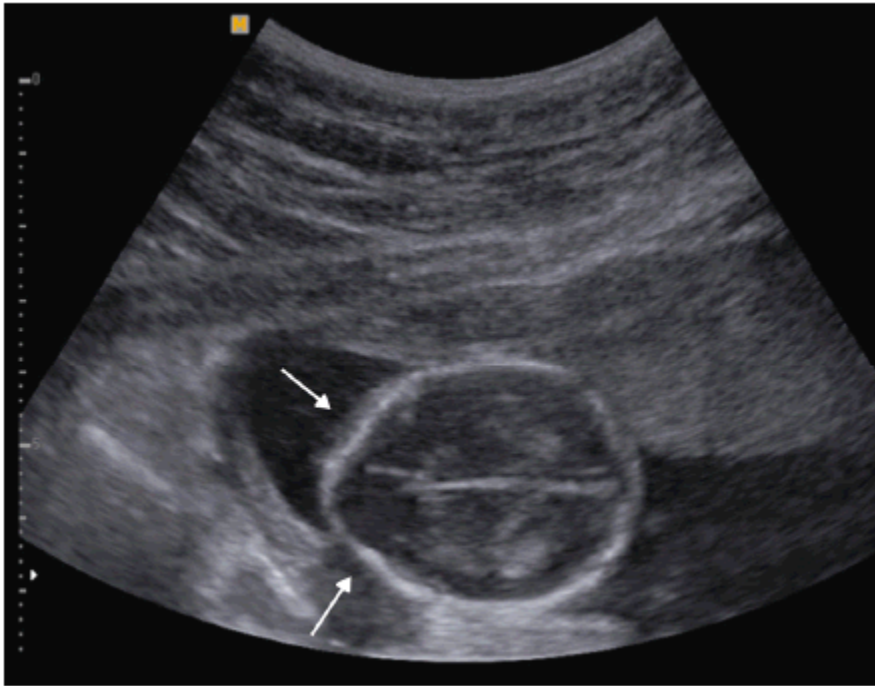


Ilustración 12. *Signo del limón* en un feto con espina bífida. Las flechas señalan el acabalgamiento de los huesos frontales que le dan al cráneo esta imagen característica cuando observamos el cerebro en corte axial. (Extraído de Ross 2014)

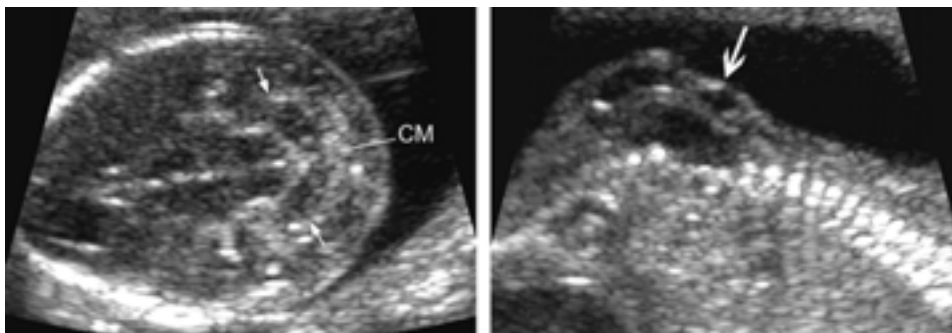


Ilustración 13. Ecografía que muestra el *signo de la banana* y el mielomeningocele lumbar de un feto de 14SG. La imagen de la izquierda es un corte axial a nivel del cráneo y las flechas señalan la imagen en banana que adquiere el cerebelo y el colapso de la cisterna magna (CM). La imagen de la derecha es un corte sagital a nivel de columna lumbosacra se señala con flechas el defecto posterior del tubo neural. (Extraído de Fong et al. 2004)

Se encuentra también un grado variable de dilatación ventricular en prácticamente todos los casos de espina bífida abierta en el momento del parto, si bien menos del 70 % de los casos diagnosticados en el segundo trimestre presentan dilatación ventricular.

Dentro del estudio de los fetos con espina bífida, se realiza un estudio de RM para el estudio del cuerpo calloso y para localizar el mielocelo. El plano axial de la columna vertebral es importante para evaluar la placoda a nivel del mielocelo, la identificación de dos hemimédulas en la diplomelia y la posibilidad de una médula anclada. Los planos sagital y

coronal a nivel del abdomen ayudan en la evaluación de anomalías y la escoliosis vertebral. Se pueden identificar anomalías gastrointestinales y urológicas, tales como el residuo postmiccional. En las RM, se deben realizar secciones finas en los tres planos del encéfalo para la evaluación de las malformaciones corticales sutiles, agenesia del cuerpo calloso, y el *beaking tectal*, que hace referencia a la fusión de los colículos inferiores del mesencéfalo, formando un solo pico que apunta hacia la región posterior y que se invagina en dirección al cerebelo (Ben-Sira et al. 2013).

Los protocolos de seguimiento fetal indican que las ecografías se deben realizar de forma mensual para valorar si existe progresión o no de la hidrocefalia, la existencia de complicaciones asociadas, y para planificar la interrupción del embarazo para que pueda producirse el parto con seguridad para la madre y el hijo (Fleischer 2009).

Un bebé con una fontanela abierta puede ser examinado mediante ecografía transfontanelar para determinar la presencia de ventriculomegalia (desde el nacimiento hasta los 18 meses aproximadamente) (Malagón-Valdez 2006).

La medición del tamaño ventricular en ecografía postnatal se suele realizar mediante el *índice caudotalámico*, que se obtiene en un corte parasagital a nivel del cuerpo del ventrículo lateral, en una imagen a través de la fontanela anterior. La distancia medida va desde la hendidura caudotalámica hasta la pared superior del ventrículo. Según este índice, la dilatación es leve si la medida está entre 5-10 mm, moderada entre 10-15 mm y grave cuando es mayor a 15 mm (Bravo et al. 2011) (Ilustración 14).



Ilustración 14. Corte sagital a nivel de la hendidura caudotalámica mostrando una dilatación ventricular de 10,4 mm (moderada). Caso de mi archivo personal.

La clasificación empleada clásicamente en la valoración de la hemorragia de la matriz germinal ha sido la de Papile (Papile et al. 1978; Papile, Munsick-Bruno, and Schaefer 1983). En ella, se definen cuatro grados según la extensión y localización de la hemorragia (ilustración 15), descritas en la tabla 3:

Grado	Descripción
Grado I	Hemorragia de la matriz germinal limitada al área caudotalámica
Grado II	Extensión intraventricular sin dilatación ventricular
Grado III	Dilatación del sistema ventricular subyacente, lleno de sangre
Grado IV	Existencia de infarto hemorrágico venoso parenquimatoso asociado

Tabla 3. Clasificación de la hemorrágica de la matriz germinal

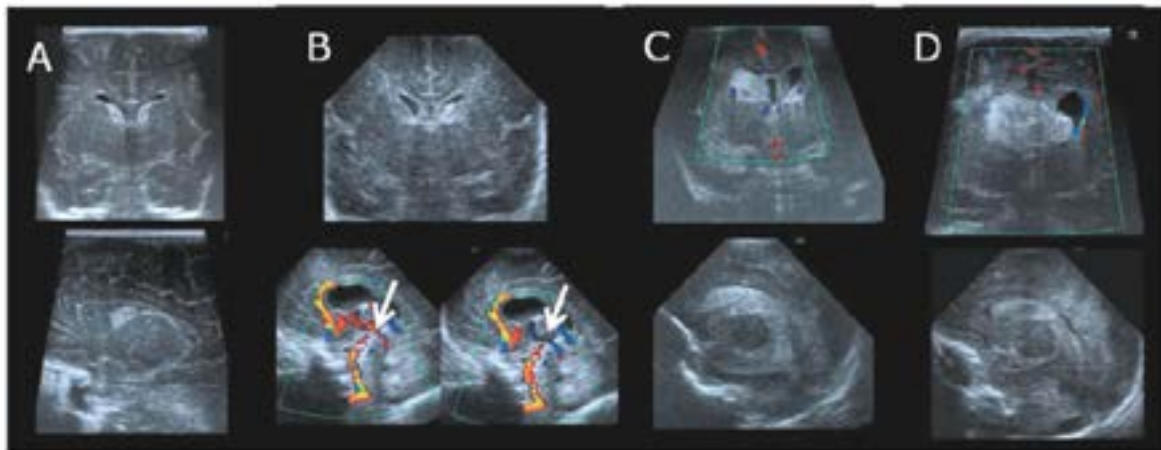


Ilustración 15. Hemorragia intraventricular en distintos grados. Imágenes coronales y sagitales-parasagiales a través de la fontanela anterior. A. Hemorragias subependimarias bilaterales (Grado I). B. Sangrado intraventricular con coágulo en el ventrículo lateral izquierdo, engrosamiento del epéndimo por ependimitis química, y señal *doppler* rojo-azul en el acueducto de Silvio (Grado II). C. Sangrado intraventricular masivo que provoca una dilatación aguda del ventrículo lateral derecho (Grado III). D. Sangrado intraventricular masivo con infarto venoso periventricular parieto-occipital derecho (Grado IV).

La dilatación ventricular tras la hemorragia aparece en torno al día 28 desde el inicio del sangrado, en la mayoría de los pacientes y está presente en todos a los tres meses del sangrado (Partridge et al. 1983). La dilatación ventricular se detiene o se resuelve en el 50-75 % de los niños con hidrocefalia poshemorrágica y comienza a las cuatro semanas de desarrollo de la ventriculomegalia (Siegel 2004).

Los estudios de RM (técnica preferida en lugar de la tomografía computerizada o TAC, ya que evita la exposición a la radiación y proporciona más información anatómica), están indicados para dilucidar la anatomía y la causa de la ventriculomegalia (Kahle et al. 2015). El problema que presenta la resonancia de cráneo en la infancia, es que precisa, en niños pequeños, de una sedación, ya que son estudios de larga duración que requieren de colaboración, por lo que en menores de tres años se tiende a realizar estudios con secuencias más rápidas potenciadas en T2 (*Fast-Spin Eco* o FSE) para acortar los tiempos de estudio. El TAC de cráneo se utiliza en casos de urgencias y en el postoperatorio inmediato, ya que es más rápido a la hora de obtener imágenes (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005).

Los estudios de Cine RM, son secuencias de flujo dinámicas que informan del movimiento del LCR y son particularmente útiles en los casos de obstrucción (Quencer 1992). Estos métodos pueden ayudar a la toma de decisiones quirúrgicas y proporcionan medios para evaluar la eficacia del tratamiento (Anik et al. 2010; Faggin et al. 2011).

2.9 Marcadores metabólicos en el líquido cefalorraquídeo

Los estudios metabólicos de LCR ofrecen un potencial para la identificación de nuevos mecanismos patógenos y marcadores de las distintas formas de enfermedades como la esclerosis múltiple o la ELA (Esclerosis Lateral Amiotrófica) (Blasco et al. 2010; Blasco et al. 2014; Reinke et al. 2014).

La *espectroscopía ^1H por resonancia magnética de alta resolución de ángulo mágico* (^1H HR-MAS MR), es una técnica que se emplea principalmente para la identificación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con la finalidad de cuantificar metabolitos. Dicha técnica utiliza la rotación a altas velocidades para obtener el *ángulo mágico* promediando las interacciones anisotrópicas, dando lugar a espectros de alta resolución a partir de tejido intacto, es decir, sin necesidad de procedimientos para la extracción de metabolitos.

La HR-MAS se utiliza para estudios metabolómicos, especialmente en la investigación del cáncer, donde el perfil metabólico (metaboloma) de biopsias de tumores se puede caracterizar usando sólo unos pocos miligramos de tejido intacto (biopsia de tejido). Los estudios con metabolómica por ^1H HR-MAS MR tienen como ventaja una fácil preparación de las muestras y evitar que éstas se destruyan.

2.10 Tratamientos en la hidrocefalia y sus complicaciones

El tratamiento fundamental en la hidrocefalia es, en muchas ocasiones, quirúrgico. El objetivo del tratamiento no consiste en lograr que los ventrículos vuelvan al tamaño normal, sino que la función neurológica sea óptima y el resultado estético sea satisfactorio.

Las opciones de tratamiento son:

1. Plexectomía coroidea. Fue descrita por Dandy (Dandy 1918) como tratamiento de la hidrocefalia comunicante. Si bien mediante esta técnica es posible reducir el índice de producción del LCR, no la detiene por completo. Se debe a que los plexos coroideos segregan sólo una porción de la producción total de LCR, y existen otras fuentes como el epitelio ependimario de los ventrículos y las vainas durales de las raíces de los nervios raquídeos. La coagulación endoscópica de los plexos coroideos fue descrita originalmente en 1910 por Victor Lespinasse (Fries and Perneczky 1999), y ha resurgido recientemente combinada con otras técnicas como la ventriculostomía endoscópica (Limbrick et al. 2014).
2. Eliminación de la obstrucción. Se realiza en los casos de tumores.
3. Ventriculostomía o ventriculocisternostomía endoscópica del tercer ventrículo.
4. Derivación. Más adelante se describen varios sistemas de derivación como la derivación ventriculoperitoneal, ventriculoauricular, ventriculopleural y la lumboperitoneal.

2.10.1 Ventriculocisternostomía bajo control endoscópico

Es el tratamiento de primera elección en la estenosis del acueducto de Silvio y consiste en comunicar, bajo control visual endoscópico, el tercer ventrículo con los espacios subaracnoideos de la base a nivel de la cisterna interpeduncular.

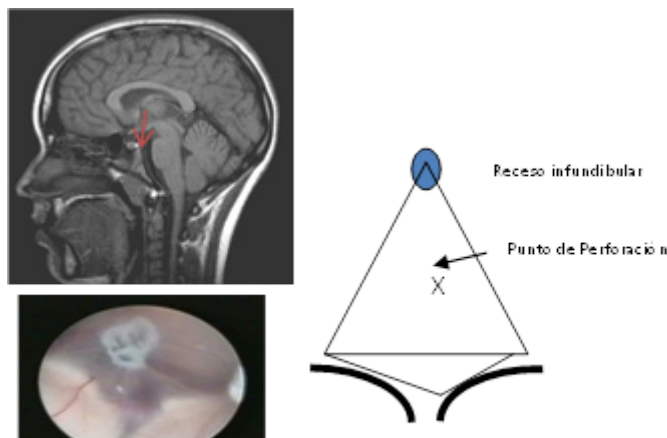


Ilustración 16. Esquema del punto de perforación en la ventriculostomía premamilar. Imagen superior izquierda: corte sagital de RM de cráneo (la flecha roja señala el trayecto de la perforación). En la imagen inferior izquierda se observa el resultado endoscópico. Foto y esquema de mi archivo personal de imagen.

La ventriculostomía premamilar ofrece ventajas significativas, ya que combina un enfoque mínimamente invasivo con un buen control visual del campo de visión, y bajo riesgo de daño vascular o neural. El punto de perforación se encuentra en el punto medio de la altura del triángulo formado por la base de los cuerpos mamilares y el vértice del receso infundibular (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005).

Las indicaciones para su intervención son, según Aguas-Valiente y Ferrer (Aguas-Valiente and Ferrer 1999):

1. Hidrocefalia obstructiva con bloqueo de la circulación del LCR entre el tercer y el cuarto ventrículo:
 - a. Obstrucción malformativa.
 - b. Estenosis del acueducto de Silvio.
 - c. Malformación de Dandy-Walker.
 - d. Malformación de Arnold-Chiari.
2. Obstrucción secundaria a Accidente Cerebro-vascular (ACV):
 - a. Hemorragia ventricular.
 - b. Sangrado cerebeloso.
3. Obstrucción tumoral:

- a. Por compresión: neoplasias pineales, ganglios de la base o cerebelosas.
 - b. Por infiltración: gliomas del tronco o neoplasias con componente exofítico al sistema ventricular.
4. Obstrucción quística no neoplásica:
- a. Tumor dermoide o epidermoide, quistes aracnoideos o quistes endodermiales.

Las ventriculostomías se obstruyen con mayor frecuencia en menores de 6 meses. Los factores relacionados con el fracaso de la ventriculostomía son:

- Edad entre 6 meses y 2 años,
- Prematuridad
- Hidrocefalia poshemorrágica
- Hidrocefalia posinfecciosa (posmeningitis)

Espina bífida donde se combinan los procesos obstructivos y la mala absorción de LCR (Heep et al. 2006).

En los niños, el índice de resultados satisfactorios puede llegar a ser bajo según Di Rocco, esto se debe a que las funciones absorbentes del espacio subaracnoideo no están normalmente desarrolladas a nivel de las granulaciones de Pacchioni (Di Rocco, Massimi, and Tamburrini 2006).

Las complicaciones que lleva asociadas según (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005) son:

1. Daño hipotalámico.
2. Parálisis transitoria de los nervios III y VI (pares craneales).
3. Hemorragia.
4. Paro cardíaco.
5. Lesión de la arteria basilar.

La tasa de éxitos oscila entre el 60 y el 90 % según la literatura (Cinalli et al. 1999; Di Rocco, Massimi, and Tamburrini 2006; Drake and Canadian Pediatric Neurosurgery Study Group 2007; Goumnerova and Frim 1997).

La ventaja de esta técnica quirúrgica consiste en evitar el implante de una prótesis de derivación, pero requiere que los sitios de absorción de LCR estén permeables.

Según Cinalli, el control radiológico de su funcionalidad se debe realizar a los tres meses del procedimiento quirúrgico y siempre que se tenga la sospecha clínica de disfunción (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005). La duración del estudio de RM es inferior a 30 minutos e incluye:

- Axial FLAIR craneal
- Localizador sagital T2, de 9 cortes finos en la línea media.

- Coronal SE T1 fino, localizado en la zona de la ventriculostomía, en los cuerpos mamilares.
- Sagital cine contraste de fase para la cuantificación visual del flujo. En diástole, el flujo de LCR tiene sentido caudo-craneal y la velocidad es positiva, por lo que aparece de color blanco en la imagen, mientras que en cine, en sístole el flujo tiene dirección cráneo-caudal y la velocidad es negativa, por lo que el LCR aparece de color negro en la imagen.

2.10.2 La derivación externa del LCR

Consiste en colocar un catéter ventricular (generalmente en el asta frontal derecha del ventrículo lateral) conectado a un sistema de conducción externo, con control del drenaje del LCR por columna hidrostática.

Es una solución de espera, usada en los casos de hidrocefalia temporal en la hemorragia subaracnoidea aguda y en el tratamiento de una sobreinfección de los sistemas de derivación. Posteriormente, algunos de estos pacientes necesitarán una derivación definitiva del LCR.

Esta técnica puede servir también para la conexión de un sistema de monitorización y vigilancia de la PIC (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005).

2.10.3 Las derivaciones internas

Permiten establecer una comunicación entre los ventrículos y una cavidad interna, por medio de un catéter con interposición de una válvula subcutánea, reguladora de la presión. La selección de la cavidad (peritoneo, aurícula derecha, pleura, vejiga, vesícula biliar) depende de cada paciente.

Sistemas de derivación:

1. **Derivación ventriculoperitoneal** (VP) (del ventrículo a la cavidad peritoneal) (Ilustración 18). Es la derivación más utilizada actualmente y de primera elección, tanto en adultos como en niños, debido a la facilidad para alargar el catéter según su crecimiento; además, las complicaciones sépticas son más fáciles de tratar.
2. **Derivación ventriculoatrial** (VA) (del ventrículo al atrio cardíaco derecho): es el lugar de destino de segunda elección en niños, ya que requiere múltiples intervenciones para alargar el catéter atrial intracardíaco. Tiene como inconveniente las complicaciones de origen vascular. Es el tratamiento de elección si el paciente sufre anomalías abdominales (intervenciones abdominales extensas, peritonitis, obesidad patológica, en niños prematuros que padecieron enterocolitis necrotizante y pueden no tolerar una derivación VP, etc.). Como ventajas, al presentar una menor longitud de los catéteres genera menor presión distal y, por lo tanto, menor efecto sifón que la derivación VP.

Complicaciones de los distintos tipos de derivación:

1. Obstrucción es la causa más frecuente de mal funcionamiento del sistema y puede ser de los siguientes tipos.
 - Proximal. En el catéter ventricular (sitio más frecuente), la obstrucción es causada por detritus en relación con la respuesta inflamatoria que se produce a nivel ventricular.
 - Disfunción de la válvula.
 - Distal. (segundo lugar en frecuencia). Se observa en el catéter peritoneal de la derivación VP y en el catéter auricular de la derivación VA. En la VP la formación de un quiste (o pseudoquiste) peritoneal suele estar asociada a una infección.
2. Desconexión en la unión o rotura en cualquier lugar.
3. Infección.
4. Convulsiones (sólo con las derivaciones ventriculares). El riesgo de padecer crisis convulsivas es de aproximadamente un 5,5 % durante el primer año una vez colocado el sistema de derivación, riesgo que se reduce al 1,1 % después del tercer año (Dan and Wade 1986) (no significa que el sistema de derivación fue el causante de todas esas convulsiones).
5. Sobredrenaje. Ocasiona los ventrículos en hendidura (ventrículos laterales totalmente colapsados) que se observan con TC en el 3-80 % de los pacientes después de colocada una derivación (Cinalli, Maixner, and Sainte-Rose 2005); la mayoría es asintomática. Estos pacientes ocasionalmente pueden presentar síntomas no vinculados a la derivación, p. ej., cefalea común. El *síndrome del ventrículo en hendidura* (SVH), se observa en menos del 12 % de todos los pacientes que tienen colocada una derivación (Cinalli et al. 1999). Está relacionado con la oclusión intermitente de la derivación. Con el paso del tiempo, muchos de estos pacientes terminan presentando baja distensibilidad ventricular, que hace que incluso una mínima dilatación cause alta presión y, por tanto, síntomas.

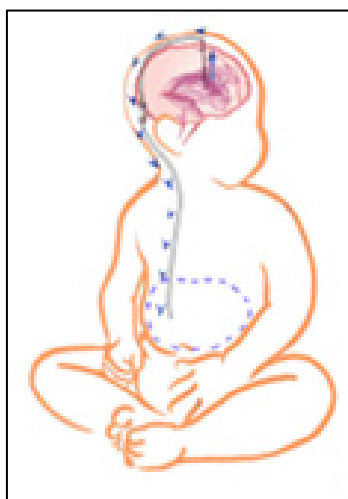


Ilustración 17. Esquema de una derivación ventrículo-peritoneal.

3. Objetivos e hipótesis

La presente Tesis Doctoral ha tenido como objetivo corroborar y trasladar a casos humanos, las evidencias experimentales que explican el origen y las consecuencias patofisiológicas de la hidrocefalia congénita, obtenidas por el grupo de investigación en modelos animales.

Para llevar a cabo el objetivo se han empleado biopsias de fetos con hidrocefalia congénita de diversos tipos, muestras de LCR de niños con hidrocefalia congénita e imágenes mediante resonancia magnética nuclear, ecografía y tomografía computerizada.

Se han tratado de corroborar las siguientes hipótesis:

1. La hidrocefalia congénita lleva implícita una afectación del neuroepitelio germinativo, que lleva a la ausencia de epéndimo. Por tanto, se consideran, en algunos casos, como patologías que implica a las células madre del SNC.

2. Las alteraciones de las células madres del SNC conducen a anomalías en la corticogénesis.

3. Las hidrocefalias congénitas aparecen como no obstructivas, y posteriormente la ausencia de epéndimo y la obliteración del acueducto de Silvio las convierte en obstructivas.

4. La ausencia del desarrollo del epéndimo conduce a la aparición de reacciones astrocitarias que tendrían un carácter beneficioso. Los astrocitos reactivos son una fuente del factor $TNF\alpha$.

5. En el LCR se existen metabolitos cuya detección indican las alteraciones en el parénquima nervioso que tienen lugar en la hidrocefalia

4. Materiales y métodos

4.1 Necropsias de fetos

En el presente estudio se han usado necropsias del SNC de dieciocho casos de hidrocefalia feto-neonatal del archivo de muestras de que dispone el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Materno-Infantil perteneciente al Hospital Regional Universitario de Málaga, que recoge muestras desde 1986. Las edades de los casos están comprendidas entre 12 semanas de gestación y tres meses posnatales.

Se han usado, como controles, muestras del mismo archivo, correspondientes a necropsias de las mismas regiones del SNC y edades aproximadas. En ninguno de los controles se encontraron alteraciones en el SNC, debido a que correspondían a fetos bien formados donde la causa de la muerte se debía a una alteración placentaria, muerte súbita o embarazo ectópico, así como a casos de Síndrome de Potter donde no se observaron alteraciones neuropatológicas, sino solo las propias de su enfermedad.

Con objetivos diagnósticos, en el Servicio de Anatomía Patológica mencionado, las necropsias de los casos controles e hidrocefálicos fueron fijadas en formol al 5 % durante 1 - 2 días. Posteriormente, fueron incluidas en parafina con la finalidad de obtener secciones de 10 μm de grosor para su tinción con hematoxilina-eosina.

En la presente Tesis Doctoral se han empleado los bloques de parafina correspondientes al ventrículo lateral, sobre todo de regiones parietales y, cuando estuvo disponible, del troncoencéfalo y la médula espinal. Tales bloques fueron usados en el laboratorio del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, para obtener secciones de parafina de 5 μm de grosor y realizar su tinción con hematoxilina-eosina, histoquímica de lectinas e inmunohistoquímica/ inmunofluorescencia.

Edad	Sexo	Etiología	Áreas estudiadas	Peso (g)
12SG	M	Hidrocefalia	Ventrículo lateral	Desc.
16SG	F	Hidrocefalia sindrómica (asociada a cromosomopatía)	Órgano subcomisural, ventrículo lateral, médula espinal	100 g
20SG	M	Mielomeningocele lumbar	Ventrículo lateral y troncoencéfalo	400 g
22SG	F	Dilatación de ventrículos laterales sin otras malformaciones asociadas	Ventrículo lateral y troncoencéfalo	200 g
23SG	F	Mielomeningocele	Ventrículo lateral y troncoencéfalo	400 g
23SG	F	Hidrocefalia posthemorrágica	Ventrículo lateral	300 g
29SG	F	Fallo hemodinámico	Ventrículo lateral	1450 g
30SG	M	Osteodisplasia	Ventrículo lateral	1100 g
31SG	M	Hidrocefalia	Ventrículo lateral	2100 g
33SG	F	Aneurisma de la Vena de Galeno (malformación cerebral)	Ventrículo lateral	3000 g
35SG	M	Hidrocefalia	Ventrículo lateral	3400 g
36SG	F	<i>Hydrops fetalis</i> (Rh+)	Ventrículo lateral	4400 g
36SG	M	Mielomeningocele y proencefalia	Ventrículo lateral, mesencéfalo, hipotálamo, IV ventrículo y médula espinal	2800 g
36SG	M	Hidrocefalia y miopatía	Ventrículo lateral y troncoencéfalo	2600 g
39SG	F	Polimalformado. Holoprosencefalia	Ventrículo lateral y troncoencéfalo	1890 g
40SG	F	Polimalformado. Síndrome de Potter IIb	Ventrículo lateral, troncoencéfalo, acueducto de Silvio	2800 g

40SG	F	Hidrocefalia. Síndrome de Dandy-Walker	Ventrículo lateral, troncoencéfalo, acueducto de Silvio, médula espinal	2890 g
3m	M	Malformación vascular	Ventrículos laterales	1650 g

Tabla 4. Casos hidrocefálicos estudiados. La edad se representa en semanas de gestación (SG) o meses posnatales (m). F, femenino; M, masculino

Como controles, se analizaron un total de 12 casos que se detallan en la siguiente tabla, con edades comprendidas entre las 12 y las 37 semanas gestacionales.

Edad	Sexo	Etiología	Área Estudio
12+3SG	M	Embarazo tubárico	Ventrículo lateral
16+2SG	M	Aborto espontáneo	Ventrículo lateral
21SG	F	Anoxia	Ventrículo lateral
21SG	M	Aborto espontáneo	Ventrículo lateral
21SG	M	Síndrome de Potter	Ventrículo lateral
22SG	M	Interrupción voluntaria del embarazo (IVE)	Troncoencéfalo
25+/-4SG	M	<i>Abruptio placentae</i>	Ventrículo lateral, tronco, médula espinal
30SG	F	Anoxia	IV ventrículo
30SG	F	Nacimiento espontáneo	Ventrículo lateral
31SG	M	<i>Abruptio placentae</i>	IV ventrículo
33+/-4SG	M	Anoxia	Ventrículo lateral, tronco
37+/-4SG	M	Muerte súbita	Ventrículo lateral, IV ventrículo

Tabla 5. Controles estudiados. La edad se representa en semanas de gestación (SG)

Todas las muestras analizadas forman parte de un archivo de excedente de diagnóstico. Los procedimientos fueron aprobados por el comité ético médico local del Hospital Regional Universitario de Málaga, en conformidad con la legislación española (Ley de Protección de Datos, BOE 298, 15/1999; Ley de Investigación Biomédica, BOE 159, 14/2007; Reglamento de Utilización de las Muestras de Origen Humano, BOE 290, RD1716 /2011).

4.2 Técnicas inmunohistoquímicas

La técnica inmunohistoquímica se empleó para: i) identificar los tipos celulares localizados en las paredes ventriculares antes y después de la pérdida del epitelio endodermiano; ii) caracterizar las células endodermianas y subendodermianas del ventrículo lateral; y iii) identificar las células productoras de $TNF\alpha$.

En este estudio se han utilizado dos técnicas inmunohistoquímicas indirectas: el método del segundo anticuerpo no marcado (método de la peroxidasa-antiperoxidasa) y el método del segundo anticuerpo biotinilado, aplicadas a secciones de parafina (5 μm de grosor) montadas en portaobjetos con una capa de poli-L-lisina o silanizados (Anexo 2.1 y 2.2, respectivamente).

Método del segundo anticuerpo no marcado (PAP) (Sternberger et al. 1970)

Este método se basa en el empleo de un anticuerpo secundario no marcado específicamente, desarrollado para reconocer las inmunoglobulinas de la especie en la que se desarrolló el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo, cuando se usa en exceso, se une por uno de los fragmentos de la región *Fab* (fracción variable) al anticuerpo primario, y por el otro al complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Este complejo está formado por tres moléculas de peroxidasa y dos moléculas de anticuerpo antiperoxidasa, desarrollados en la misma especie que el anticuerpo primario. La peroxidasa se detecta al reaccionar con su sustrato natural, el peróxido de hidrógeno, en presencia de un donador de electrones, en nuestro caso, la molécula 3-3'-diaminobencidina (DAB). Como producto de la reacción de oxidación se origina un compuesto coloreado e insoluble, fácilmente detectable.

Método del segundo anticuerpo biotinilado

Este método se basa en la alta afinidad que existe entre la biotina (vitamina H) y la avidina, glucoproteína presente en la clara de huevo, sintetizada también por algunas bacterias. Ambas moléculas se unen entre sí con rapidez y de forma específica, generando enlaces fuertes de tipo no covalente, siendo la unión reversible a pH ácido. Esta técnica tiene una gran sensibilidad y amplifica notablemente la señal. Usualmente, en este método de reconocimiento del antígeno, el anticuerpo secundario es el que está conjugado a biotina, que es la forma usada en la presente Tesis y por tanto es una inmunohistoquímica indirecta. Tras la adición de la solución con avidina conjugada con un marcador, se forma un complejo anticuerpo primario + anticuerpo secundario biotinilado + avidina conjugada que es reconocido por la enzima/ fluorocromo al que se haya conjugado la avidina, en nuestro caso, peroxidasa de rábano. Tras su revelado con DAB, la peroxidasa genera un precipitado de color marrón fácilmente detectable.

El protocolo general de inmunohistoquímica utilizado, ha sido:

- Desparafinado e hidratación (Anexo 1.7)¹
- Lavado en tampón 2x5 min
- Desactivación de la peroxidasa endógena (Anexo 3.1) 15 min
- Lavado en tampón 2x5 min
- Digestión con proteinasa K a temperatura ambiente² 5 min
- Lavado en tampón 2x5 min
- Intensificación con microondas (Anexo 3.3 y 3.4)² 2x5 min
- Lavado en tampón 2x5 min
- Formación de una barrera hidrofóbica con *PAP-pen*
- Preincubación en solución inactivadora de uniones inespecíficas (Anexo 3.2) 30 min
- Incubación en anticuerpo primario³ 18 h
- Lavado en tampón 3x5 min
- Incubación en anticuerpo secundario^{3, 4} 1 h
- Lavado en tampón 3x5min
- Incubación en avidina (ExtrAvidin)/ PAP^{3, 5} 1 h
- Lavado en tampón 3x5 min
- Revelado histoquímico mediante DAB (Anexo 3.6)¹ 10 min
- Deshidratación y aclarado en xileno (Anexo 1.7)¹
- Montaje de cortes

1 Estos pasos se realizaron bajo campana extractora de gases.

2 Estos pasos se realizaron sólo en la inmunodetección de algunos antígenos.

3 La incubación de los anticuerpos, de la avidina y de las soluciones de preincubación se realizaron en gota y en cámara húmeda a una temperatura constante de 22 °C.

4 Puede estar biotilado o no. En el segundo caso se empleó para el método del PAP.

5 La avidina o el PAP se emplearon según el método inmunohistoquímico.

Cuando se empleó el método del PAP, se usó a una dilución 1:200. La avidina (ExtrAvidin, Sigma) se utilizó a la dilución 1:2000. El DAB se usó diluido al 0,025 % y el H₂O₂ al 0,05 %.

La reacción del DAB en algunos casos se intensificó añadiendo sulfato amónico de níquel (Anexo 3.5).

Como tampones se emplearon: PBS 0,01 M, pH 7,3 (Anexo 1.2) o Tris-PBS 0,1 M pH 7,8 (Anexo 1.3).

Como diluyentes de los anticuerpos se usaron:

-Tris-PBS/ PBS, con 5 % de suero normal de oveja (SNO), 0,1 % de Triton X-100 (Sigma) y un 0,1 % de azida de sodio para los anticuerpos obtenidos en conejo, su secundario respectivo y la etapa de preincubación. Según el diluyente, el tampón de lavado fue Tris-PBS o PBS.

-Tris-PBS/ PBS, con 2 % de suero normal de conejo, 0,1 % de Triton X-100 y un 0,1 % de azida de sodio para los anticuerpos obtenidos en ratón o cabra, sus secundarios respectivos y la etapa de preincubación. Según el diluyente, el tampón de lavado fue Tris-PBS o PBS.

-Tris-Carragenina-Tritón (TCT; Anexo 1.5). Cuando se usó este diluyente, el tampón de lavado fue Tris-PBS.

La avidina, el PAP y el DAB se diluyeron en PBS o Tris-PBS.

La preincubación, cuando se empleaban anticuerpos secundarios biotinilados, llevaba 4 gotas por mililitro de tampón, de la solución *Avidin*, que forma parte del *Avidin-Biotin Blocking Kit* (Vector, ref. SP-2001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos primarios en esos casos incorporaban 4 gotas/ml de diluyente de la solución *Biotin* del mismo kit, de acuerdo con las instrucciones. Ambas soluciones se emplean para bloquear uniones inespecíficas debidas a la biotina presente en el tejido y a la avidina.

4.2.1 Anticuerpos estudiados

Los anticuerpos empleados y sus referencias, y otros reactivos relacionados se resumen en las siguientes tablas:

Antígeno	Anticuerpo primario, tipo; referencia (dilución de uso)
CD99	Anti-CD99, monoclonal de ratón; Dako b8855, clon 12E7(1:400)
GFAP	Anti-proteína acida fibrilar glial, policlonal de conejo; Biogénesis 4650-0100 (1:100)
Macrófagos	Anti-macrófagos humanos, monoclonal de ratón; Sigma, clon LN-5 (1:400)
Vimentina	Anti-vimentina, monoclonal de cabra; Sigma, ref. V4630 (1:500)
Tubulina β III	Anti-tubulina β III, monoclonal de ratón; Promega, clon 5G8 purificado (1:5000)
Caveolina-1	Anti-caveolina 1, monoclonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology, clon N-20 (1:2000)

Cadherina	N-cadherina, monoclonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology (1:50)
Pan-cadherina	Reconoce todos los subtipos de cadherinas, monoclonal de ratón; Sigma, ref. C1821 (1:500)
S100β	Anti-S100β, policlonal de conejo; Abcam ab52642 (1:200)
EEA1	Anti-antígeno 1 de endosoma temprano, policlonal de conejo; Affinity Bioreagents, ref. INCPA1-063 (1:200)
TNFα	Anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), monoclonal de ratón; Abcam, ref. ab34719 (1:100)
Nestina	Anti-nestina, monoclonal de conejo; DSHB, ref. Rat-401 (1:200)
AQP-4	Anti-acuaporina 4, policlonal de conejo; Sigma, ref. A5971 (1:400)
Tubulina-βIV	Anti-tubulina βIV, monoclonal de ratón; Abcam (1:100)
Iba-1	Anti-IBA1, molécula adaptadora de unión a calcio iónico (<i>Ionized Calcium-Binding Adapter molecule 1</i>), policlonal de conejo; Dako, ref. 19-19741 (1:500)
LFA	LFA, policlonal de conejo; Donación del Dr. E.M. Rodríguez (Universidad Austral de Chile)

Tabla 6. Anticuerpos primarios estudiados. Abcam, Cambridge, RU; Affinity Bioreagents INC, Gonden, CO, EEUU; Biogenesis, Oxford, RU; Dako, Glostrup, Dinamarca; DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, EEUU; Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, EEUU; Sigma, San Luis, MO, EEUU.

Anticuerpos Secundarios	Referencia	Origen, dilución de uso
Anti-IgG de ratón	Sigma, M7023	Desarrollado en conejo, 1:50
Anti-IgG de conejo	Sigma, A6154	Desarrollado en cabra, 1:50
Anti-IgG de cabra	Sigma, G5268	Desarrollado en conejo, 1:50
Anti-IgG de ratón, biotinilado	Dako, E0433	Desarrollado en cabra, 1:500
Anti-IgG de conejo, biotinilado	Dako, E0432	Desarrollado en cabra, 1:500
Anti-IgG de cabra, biotinilado	Dako, E0466	Desarrollado en conejo, 1:500

Tabla 7. Anticuerpos secundarios

Estreptavidina/ PAP	Referencia	Dilución
ExtrAvidin® conjugada a peroxidasa de rábano	Sigma, E2806	1:2000
PAP de ratón	Dako, B0650	1:400
PAP de conejo	Dako, Z0113	1:200
PAP de cabra	Sigma, P3029	1:200

Tabla 8. Estreptavidina y PAP

4.2.2 Técnicas histoquímicas

Las lectinas son proteínas que se unen de forma específica a carbohidratos concretos. En este trabajo se utilizaron lectinas sobre secciones de tejido para estudiar la presencia de ciertos azúcares en el epéndimo. Las lectinas empleadas y sus afinidades específicas se recogen en la siguiente tabla.

	Procedencia de la lectina	Antígeno	Dilución	Referencia
LFA	<i>Limax flavus</i>	Ácido siálico terminal	7 µg/ml en Tris-PBS	Calbiochem, ref. 122129
Lectina de tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Oligómeros de N-acetilglucosamina	5 µg/ml en PBS	Vector, ref. B1175
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Galactosa terminal	4 µg/ml en PBS	Vector, ref. B1075

Tabla 9. Lectinas utilizadas. VectorLaboratories, Burlingame, CA, EEUU.

Las incubaciones de las lectinas se realizaron durante una hora a 37 °C, en cámara húmeda.

LFA:

La lectina LFA (*Limax flavus agglutinin*), procedente del gasterópodo conocido como *babosa amarilla*, es una aglutinina que presenta una afinidad exclusiva por las proteínas sializadas, es decir con residuos glucídicos que terminan en ácido siálico. Su unión se detectó con un anticuerpo contra la LFA, mediante inmunohistoquímica.

Lectina de tomate:

La lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., o *Solanum lycopersicum* L.), tiene afinidad por los oligómeros de N-acetilglucosamina, preferiblemente trímeros y tetrámeros de

este azúcar. La lectina usada estaba biotinilada, por lo que se detectó mediante avidina conjugada con peroxidasa, siguiendo el procedimiento histoquímico.

PNA:

La lectina del cacahuete *Peanut Agglutinin* (PNA), presenta afinidad por la galactosa terminal unida a un residuo de N-acetil-glucosamina o N-acetil-galactosamina (Gal β 1,4-GlcNAc/ GalNAc). Se detectó de igual forma que la lectina de tomate.

4.3 Técnicas de inmunofluorescencia

El protocolo general empleado para técnicas de inmunofluorescencia fue:

- Desparafinado y deshidratación de los cortes (Anexo 1.7)
- Lavados en PBS (Anexo 1.2)
- Intensificación con microondas (Anexo 3.3 y 3.4)
- Lavados en PBS
- Aplicación de cerco hidrofóbico mediante *PAP-pen*
- Incubación del primer anticuerpo durante 18 horas a 20 °C
- Lavados en PBS
- Incubación durante 1 hora a 20 °C en segundo anticuerpo fluorescente según el anticuerpo primario haya sido obtenido en conejo (policlonal) o en ratón (monoclonal):
 - Anti-IgG de conejo obtenido en burro conjugado con Alexa Fluor® 488 (LifeSciences, A10037). Diluido 1:2000. Excitación aproximada en 495 nm con máximo de emisión en 519 nm (verde).
 - Anti-IgG de ratón obtenido en burro conjugado con Alexa Fluor® 568 (LifeSciences, A2106). Diluido 1:2000. Excitación aproximada en 578 nm con emisión en 603 nm (rojo).
- Lavados en PBS
- Incubación en 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes, ref. D1306), que absorbe a 358 nm unido al ADN y emite en 461 nm (azul), diluido 300 nM en PBS, durante 30 segundos.
- Lavados en PBS
- Montaje en medio para fluorescencia (Dako, ref. S3023)
- Almacenamiento a 4 °C en oscuridad durante 1 semana y posteriormente a -20 °C

Los anticuerpos que se han estudiado con inmunofluorescencia son:

Antígeno	Anticuerpo primario. Referencia. (Dilución)
GFAP	Anti-proteína acida fibrilar glial, policlonal de conejo; Biogénesis 4650-0100 (1:100)
Caveolina-1	Anti-caveolina 1, monoclonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology, clon N-20 (1:2000)
Cadherina	N-cadherina, monoclonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology (1:50)
Pan-cadherina	Reconoce todos los subtipos de cadherinas, monoclonal de ratón; Sigma, ref. C1821 (1:500)
S100β	Anti-S100β, policlonal de conejo; Abcam ab52642 (1:200)
TNFα	Anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), monoclonal de ratón; Abcam, ref. ab34719 (1:100)
Tubulina-βIV	Anti-tubulina βIV, monoclonal de ratón; Abcam (1:100)
AQP-4	Anti-acuaporina 4, policlonal de conejo; Sigma, ref. A5971 (1:400)
Iba-1	Anti-IBA1, molécula adaptadora de unión a calcio iónico (<i>Ionized Calcium-Binding Adapter molecule 1</i>), policlonal de conejo; Dako, ref. 19-19741 (1:500)

Tabla 10. Anticuerpos primarios

Anticuerpos Secundarios	Referencia	Dilución	Origen
Anti-IgG de ratón, biotinilado	Dako, ref. E0464	1:2000	Desarrollado en conejo
Anti-IgG de conejo, biotinilado	Dako, ref. E0432	1:500	Desarrollado en cabra
Anti-IgG de cabra, biotinilado	Dako, ref. E0466	1:500	Desarrollado en conejo
Anti-IgM de ratón, biotinilado	Vector, ref. BA-2020 BIOT	1:500	Desarrollado en cabra

Anti-IgG de conejo conjugada con Alexa Fluor 488	Invitrogen, ref. A21206	1:2000	Desarrollado en burro
Anti IgG ratón conjugada con Alexa Fluor 568	Invitrogen, ref. 10037	1:2000	Desarrollado en burro

Tabla 11. Anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromo

Estreptavidina	Referencia	Dilución
Estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488	Invitrogen, ref. S11223	1:2000

Tabla 12: Estreptavidina conjugada con fluorocromo

En el caso de la doble fluorescencia, se combinaron anticuerpos obtenidos en conejo con anticuerpos desarrollados en ratón. Se incubó, secuencialmente, un primer anticuerpo seguido de su secundario correspondiente y, a continuación, el siguiente primario y su secundario específico.

Ejemplos:

- GFAP (ratón) + acuaporina 4 (conejo)
- GFAP (ratón) + S100 β (conejo)

Como diluyentes de los anticuerpos se empleó PBS con un 0,01 % de Tritón X-100 y 0,01 % de azida sódica.

Las incubaciones de los anticuerpos se realizaron en gota en una cámara húmeda y en oscuridad.

Las inmunotinciones fueron estudiadas y fotografiadas en un microscopio láser confocal Leica SP5 II.

4.4 Muestras del líquido cefalorraquídeo humano

Para el presente estudio, se han obtenido muestras de LCR humano en los casos con hidrocefalia mediante punción directa del ventrículo lateral, bien a través de un drenaje externo, bien a través de una válvula de derivación, o bien durante una ventriculostomía

endoscópica en quirófano. El LCR de los casos controles es proveniente de punciones lumbares realizadas en urgencias, en los casos en los que el caso clínico lo requería para descartar otras enfermedades. En esos casos controles no se detectaron infecciones del SNC.

En todos los casos se ha trabajado con excedente diagnóstico y en ningún caso se han obtenido muestras intencionales para la investigación.

Los procedimientos fueron aprobados por el comité ético médico local del Hospital Regional Universitario de Málaga, de conformidad con la legislación española (Ley de Protección de Datos BOE 298, 15/1999; Ley de Investigación Biomédica, BOE 159, 14/2007; Reglamento de la Utilización de Las muestras de origen humano, BOE 290, RD1716/2011).

Las muestras se obtuvieron en el Hospital Materno-Infantil (Hospital Regional Universitario de Málaga) y en el Hospital Universitario de las Islas Canarias, de La Laguna, Tenerife. Se centrifugaron a 2500 rpm y se almacenaron a -20 °C ó -80 °C, en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga o en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de la Laguna, Tenerife, Islas Canarias. Las muestras que se guardaron en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga, forman parte actualmente del archivo del Biobanco Andaluz, que está localizado en el Pabellón C del Hospital Regional Universitario de Málaga.

En algunos casos procedentes del Hospital Materno-Infantil (Hospital Regional Universitario de Málaga), por razones clínicas diversas, se obtuvieron muestras en diferentes momentos (denominadas “múltiples”: a, b, etc.). En la siguiente tabla se indican los casos estudiados:

Número del caso	Tipo de hidrocefalia	Edad	Muestras múltiples
C1	Obstruktiva	37 semanas de gestación	
C2	Obstruktiva	1 - 5 días	
C3	Obstruktiva	1 - 5 días	
C4	Obstruktiva	1 - 5 días	
C5	Obstruktiva	4 meses 5 meses 5 meses 8 meses 8 meses	a b c d e
C6	Obstruktiva	3 meses 4 meses 4 meses	a b c
C7	Obstruktiva	8 meses 8 meses 8 meses	a b c
C8	Poshemorrágica	1 - 5 días	
C9	Poshemorrágica	1 - 5 días	
C10	Poshemorrágica	1 - 5 días	
C11	Poshemorrágica	1 - 5 días	
C12	Poshemorrágica	10 días	
C13	Poshemorrágica	6 meses	
C14	Poshemorrágica	1 mes 2 meses	a b
C15	Poshemorrágica	4 meses 18 meses 24 meses 24 meses	a b c d
C16	Síndrome de Dandy-Walker	1-5 días	
C17	Síndrome de Dandy-Walker	2 meses 12 meses	a b

C18	Comunicante	38 semanas de gestación	
C19	Comunicante	1 - 5 días	
C20	Comunicante	1 - 5 días	
C21	Comunicante	1 - 5 días	
C22	Comunicante	1 - 5 días	
C23	Comunicante	1 - 5 días	
Ctrl1	Control	34 semanas de gestación	
Ctrl2	Control	1 día	
Ctrl3	Control	1 día	
Ctrl4	Control	1 día	
Ctrl5	Control	1 día	
Ctrl6	Control	1 mes	
Ctrl7	Control	1 mes	
Ctrl8	Control	9 meses	
Ctrl9	Control	9 años	

Tabla 13. Casos y controles de hidrocefalia. C, caso; Ctrl, control.

4.5 Metabolómica del líquido cefalorraquídeo

Para el estudio metabolómico de las muestras de LCR hemos utilizado la metodología *High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)*, empleando un espectrómetro de resonancia magnética (RM) *Bruker AVANCE 600 MHz*.

Las muestras se descongelaron durante 15 - 20 minutos. Se mezclaron 150 μ l de LCR de cada caso con 390 μ l de agua ultrapura (Milli-Q bidesionizada) y 60 μ l de tampón que contiene 1,5 M de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$, 2 mM de NaN_3 y 0,1 % de TSP (sal de sodio del ácido 3-(Trimetilsilil)-propiónico-2,2,3,3- d_4 , Aldrich). El TSP se empleó como referencia de desplazamiento químico ($\delta = 0,00\text{ppm}$) y como referencia interna de concentración (5,8 mM).

Las medidas de RMN de las muestras de LCR se realizaron con una criosonda de 5 mm *TCI Prodigy* refrigerada con nitrógeno y con una unidad de BCU (*Bruker Cooling Unit*) para el control de temperatura. Los espectros 1D ^1H -RMN fueron adquiridos a 300K (27 °C) (se esperó 5 minutos para estabilizar la temperatura de la muestra), empleando la secuencia de pulsos *noesygppr1d* con pre-saturación de agua, 12 KHz de ancho espectral, 64k puntos de datos, 128 promedios (*scans*).

Una vez finalizados los experimentos, todas las muestras fueron conservadas a 4 °C hasta que fueron trasvasadas a un tubo de microcentrífuga tipo *Eppendorf* y congeladas de nuevo a -80 °C.

La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo mediante integración del área de los picos utilizando como referencia interna el área del TSP (5,8 mM). Los resultados se expresaron en partes por millón. Los metabolitos más comúnmente estudiados en el SNC son los siguientes:

- La α glucosa es un metabolito que tiene relación con el consumo de glucosa a nivel parenquimatoso o bien, en los casos de infección, por el consumo de glucosa del microorganismo que produzca la infección.
- El lactato no debe aparecer en condiciones normales en el LCR ya que es producto de un metabolismo anaerobio y sugiere isquemia cerebral. En los casos de hidrocefalia se interpreta como aumento de la presión intracraneal que induce isquemia cerebral, al tener presiones intracraneales más altas que las presiones vasculares, con lo que induce un déficit en el riego vascular cerebral y un metabolismo anaerobio.
- La creatina se relaciona con el metabolismo energético y se ve disminuida en algunos tumores respecto al parénquima cerebral. En los casos de hidrocefalia, su aumento o disminución se relaciona con la actividad metabólica a nivel del parénquima cerebral.
- El mioinositol no tiene una función claramente conocida pero se relaciona con la actividad glial y podría ser un marcador de necrosis del parénquima cerebral.
- El N-acetilaspártato es un indicador de viabilidad neuronal.
- La colina es un marcador implicado en el metabolismo de membranas celulares y la proliferación celular.

4.6 ELISA para TNF α en líquido cefalorraquídeo

Para la detección del factor de necrosis tumoral (TNF α), se utilizó un kit comercial para ensayos de tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ultrasensible (Invitrogen, ref. KHC3013), y específico para el TNF α humano, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 50 μ l de cada muestra no diluida por duplicado. La concentración inicial de proteína en cada muestra se determinó usando una prueba de colorimetría basada en el ácido bicinónico (BCA), usando un kit de ensayo comercial (Pierce, ref. 23225).

Para la representación de datos y estadísticas, se utilizó el software KaleidaGraph (Synergy). Para establecer la significación de las diferencias entre los grupos, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney.

4.7 Estudios de imagen de casos hidrocefálicos

Para estudiar el SNC de los casos humanos hemos utilizado un equipo de RM y un equipo ecográfico.

La ecografía en el periodo fetal es realizada tanto por ginecólogos como por radiólogos, siguiendo estrictamente un protocolo mínimo de estudio del SNC que incluye imágenes a distintos niveles (Ilustración 18).

Los equipos de ecografía disponibles en el Hospital Materno-Infantil (Hospital Regional de Málaga) son un ecógrafo modelo TOSHIBA Aplio™ 300 Platinum Series, en la sala de ecografía y un ecógrafo portátil para el estudio posnatal modelo PHILIPS HD11 XE. Se utilizaron sondas lineales de 8-10 MHz, sondas de cráneo de 5-7,5 MHz, sondas convexas para estudios de abdomen de entre 3-5 MHz y sondas vaginales de 5-7 MHz.

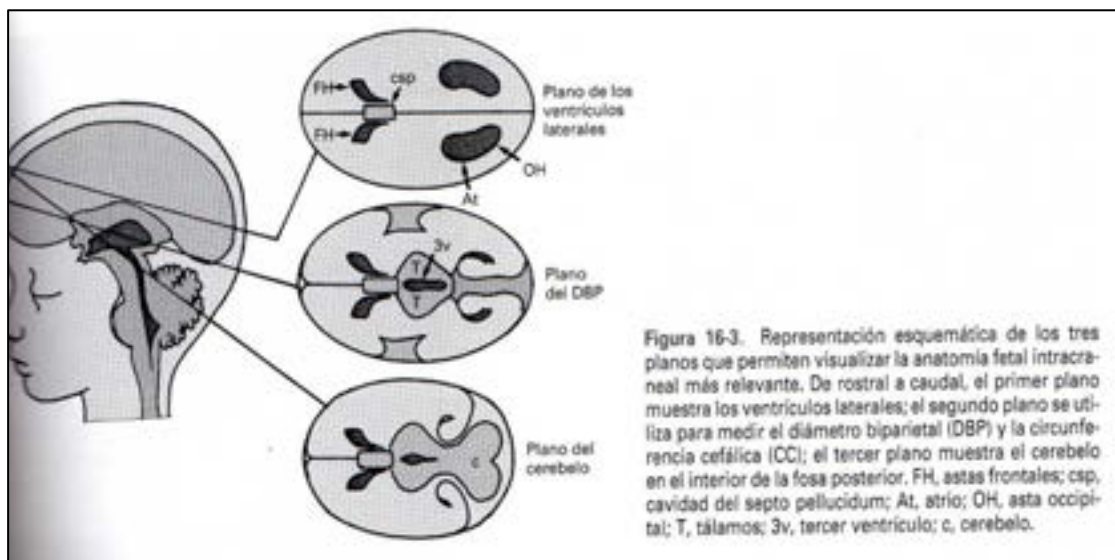


Ilustración 18. Esquema donde se identifican los cortes anatómicos necesarios para el estudio del cerebro fetal. (Extraído de Fleischer 2009)

Posnatalmente, la sistemática de estudio del cráneo del recién nacido incluye la ecografía en escala de grises a través de la fontanela anterior, en planos coronales y sagitales (Rumack, Wilson, and Charboneau 1999). Este estudio básico se puede complementar con el uso del *Doppler color* y el *Doppler pulsado*, que proporcionan información sobre la hemodinámica e hidrodinámica cerebral (Couture et al. 2001), y con la utilización de otras vías de abordaje como la fontanela posterior, la postero-lateral o mastoidea (Enriquez et al. 2006), que resultan muy útiles para la valoración de la fosa posterior, o incluso el agujero magno (Taylor 2001) (Ilustración 19 y 20).

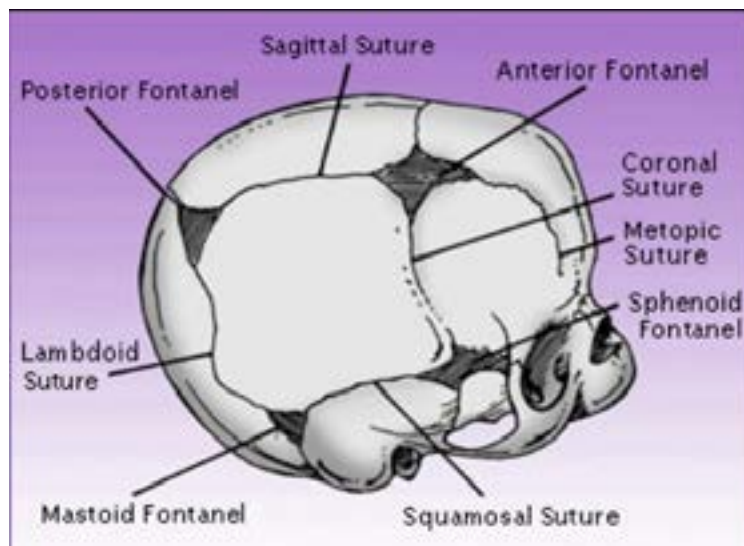


Ilustración 19. Esquema de las fontanelas útiles para el estudio ecográfico.

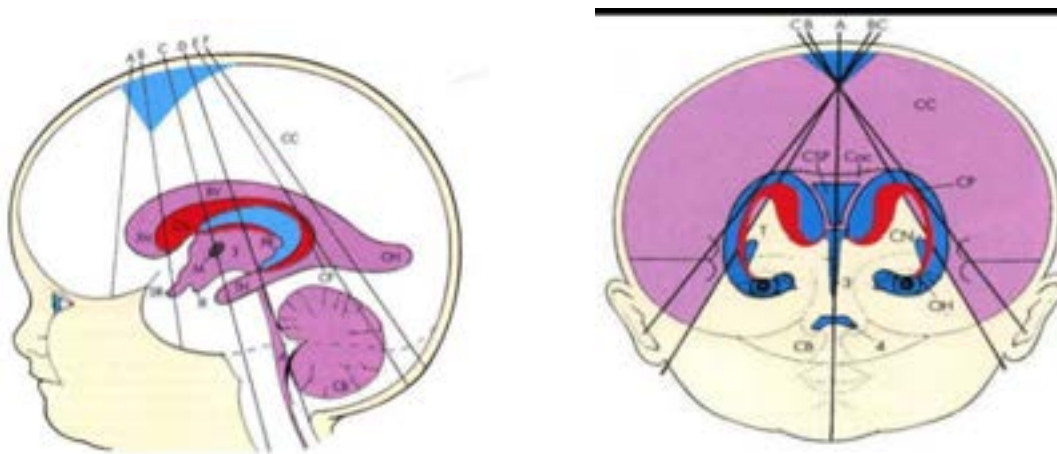


Ilustración 20. Esquema de los cortes coronales y sagitales que se pueden obtener a nivel de la fontanela anterior; CC: corteza cerebral, BV: ventrículo lateral, FH: asta frontal, OH: asta occipital, CN: núcleo caudado, M: comisura intertalámica, PR: receso pineal, 3: III ventrículo, TH: asta temporal, SR: receso supraóptico, IR: receso infundibular, CP: plexo coroideo, 4: IV ventrículo, CB: cerebelo, CSP: *cavum* del *septum pellucidum*, COC: cuerpo calloso, T: tálamo. (Extraído de Rumack, Wilson, and Charboneau 1999).

El equipo de RM utilizado en la resonancia fetal y posnatal, se trata de una *Signa Excite HD 1.5 T-General Electric Healthcare*, con un campo de 1,5 T.

Se ha utilizado una antena de superficie de 8 canales. El radiólogo estuvo todo el tiempo siguiendo el estudio en la consola. Los pacientes estuvieron en la posición supina o

decúbito lateral, y para minimizar la sensación de claustrofobia los pies entraron primero en el imán.

Para el estudio fetal se utilizaron secuencias potenciadas en T2 conocidas como *eco de espín rápido y disparo único* (SSFSE, *Single-Shot Fast Spin-Echo*) o *eco de espín turbo y disparo único con adquisición semi-Fourier* (HASTE, *Half-Fourier Acquisition Single-Shot Turbo Spin-Echo*). El uso de estas secuencias de pulsos rápidos permitió que la imagen se pudiera adquirir en menos de un segundo, lo cual es importante para reducir la probabilidad de movimiento fetal. En algunos casos, tales como imágenes de gemelos o de un feto con mielomeningocele, la antena a veces tuvo que ser recolocada durante el examen. Cada secuencia se utilizó como el explorador de la secuencia subsiguiente. De esta manera se obtuvieron conjuntos de imágenes coronales, axiales y sagitales del cerebro fetal.

En el caso de niños pequeños, la sedación fue obligatoria, así como en los pacientes que no cooperaron. Se utilizó siempre una antena de superficie de cráneo que debió ser adecuada para el tamaño del paciente. El protocolo de estudio incluyó secuencias FLAIR (*Fluid-Attenuated Inversion Recovery*) coronales y axiales con 3 mm de grosor de corte y de 0 a 1 mm de separación entre cortes. También se obtuvo una secuencia convencional (3 mm) potenciada en T2 en plano axial y coronal. No se requirió gadolinio como contraste salvo que se estudiara un tumor o una malformación vascular. En los recién nacidos, las secuencias T1 debieron adaptarse al SNC inmaduro usando tiempos de repetición y de eco más largos. En ocasiones se realizaron otras secuencias como T2 eco de gradiente (GE o T2*), e imágenes de difusión.

En el caso de niños mayores y adultos, se utilizó una antena de superficie de cráneo, con un protocolo de estudio de RM craneal que incluye:

- Sagital T1.
- Axial T2 TSE.
- Axial T2 FLAIR.
- Difusión.
- Secuencias de flujo a nivel del acueducto de Silvio (opcional).
- Estudio de mielomeningocele (sólo en casos de espina bífida).

5. Resultados

5.1 El epéndimo de fetos humanos controles

La pared ventricular de SNC de un feto de 12SG, muestra en la Zona ventricular (ZV) un neuroepitelio pseudoestratificado (lámina 1 A). Sus células aparecen expresando ácido siálico, marcado con la lectina LFA, sobre toda su superficie celular, aunque con un marcaje más pronunciado en la región apical en contacto con la superficie ventricular (lámina 1 B).

En estadios posteriores, como se puede observar en un feto con 16SG, que presenta un desarrollo más avanzado de la corteza cerebral existe una ZV más delgada, y debajo una zona subventricular (ZSV), la zona intermedia y la subplaca (lámina 1 C y D). Entre las células del neuroepitelio que ocupa la ZV en esta edad (lámina 1 C y 2 A), se pueden observar células con aspecto de glía radial, que expresan nestina (lámina 1 D), GFAP (lámina 2 B) y vimentina (lámina 2 C).

En fetos de edades de gestación más avanzadas como 23SG, todavía es posible observar algunas células con aspecto de glía radial con prolongaciones basales largas positivas presentando GFAP (lámina 3 A). El epéndimo multiciliado maduro expresa vimentina, la proteína S100 β , y ácido siálico en su glicocáliz apical (lámina 3 B). Todavía, en algunas de las paredes ventriculares de fetos de 23SG, es posible observar la presencia de células de la glía radial mediante la expresión de GFAP, que pone de manifiesto sus largas prolongaciones basales (lámina 3A). En la ZV de casos controles de 25SG es posible detectar la presencia de epéndimo multiciliado maduro con ácido siálico (marcado mediante la lectina LFA) en el glicocáliz de la membrana plasmática de su dominio apical, en contacto con el ventrículo (lámina 3 A). En los fetos con más de 35SG fue posible apreciar un epéndimo completamente diferenciado multiciliado (lámina 3 C y D).

La caveolina-1, es una proteína ligadora de colesterol y es un componente principal de invaginaciones de membrana plasmática conocidas como caveolas. Las caveolas están implicadas entre otros procesos en la endocitosis/transcitosis. La caveolina-1 se expresa en el neuroepitelio de fetos controles de 16SG (lámina 4 A). Los procesos basales de la glía radial no mostraron la presencia de caveolas con caveolina-1 (lámina 4 A). En edades posteriores, en torno a las 22SG, comienzan a aparecer células ependimarias en la ZV que expresan caveolina-1 presente en la región supranuclear del citoplasma, y en sus prolongaciones basales más o menos largas (lámina 4 B). En el epéndimo maduro, que claramente constituye una monocapa de células cúbico-cilíndricas, y que se encuentra en los fetos a término de 40SG, expresan caveolina-1 formando acúmulos situados en las regiones supra y infranuclear del citoplasma (lámina 4 C).

Los plexos coroideos están desarrollados en los fetos controles de 16SG (lámina 5), mostrando su epéndimo especializado maduro con aspecto cúbico monoestratificado. Estas células expresan vimentina (lámina 5 B), y mostraban caveolas marcadas con caveolina-1 en todos sus dominios de la membrana plasmática (lámina 5 C).

En algunos de los fetos controles fue posible localizar el acueducto cerebral delimitando una luz estrecha (lámina 6).

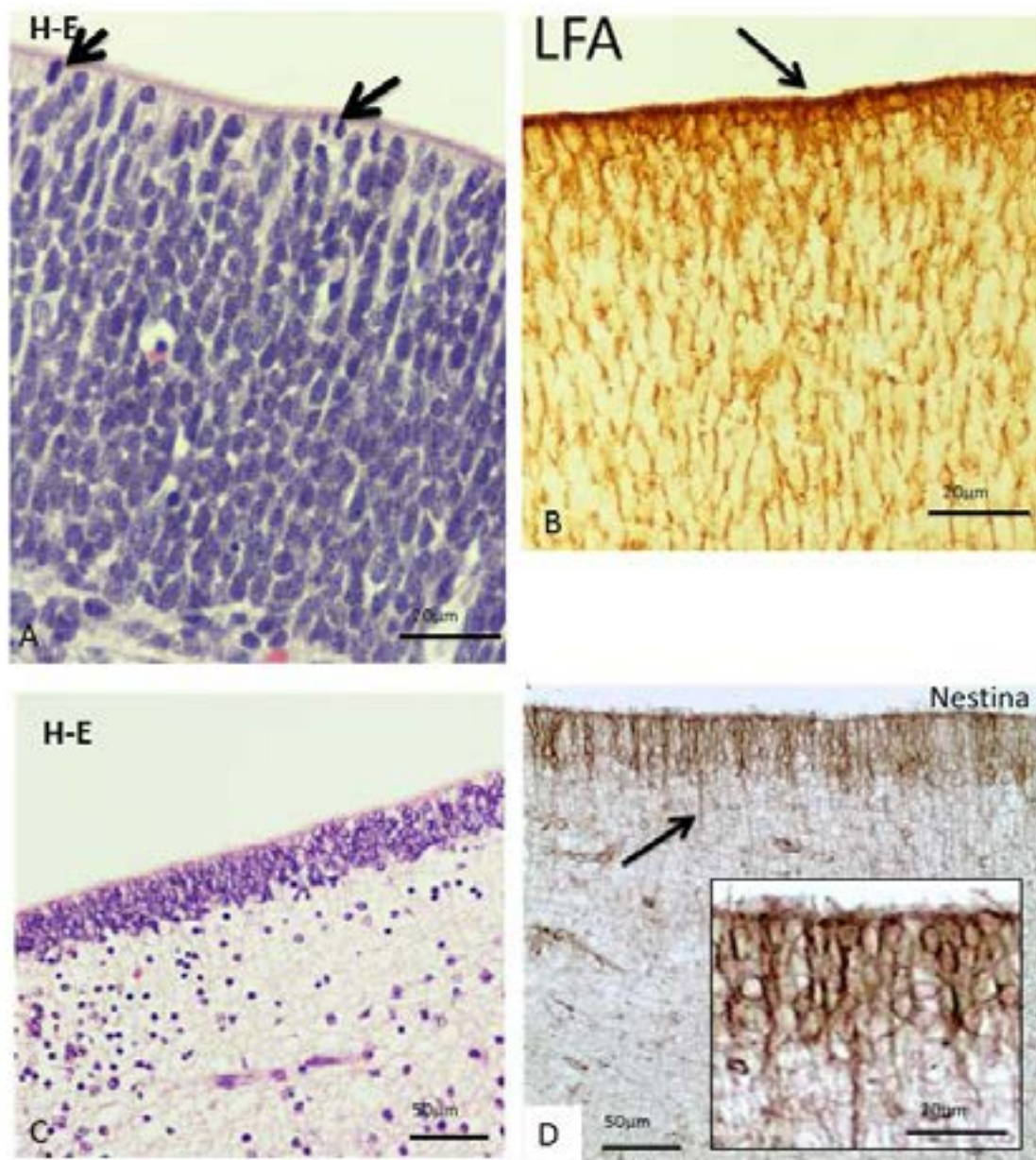


Lámina 1. A. Superficie ventricular en un control masculino de 125G. Hematoxilina-eosina. Se pone de manifiesto el neuroepitelio de la ZV. Se aprecian metafases (flechas) perpendiculares a la superficie ventricular (V). B. Superficie ventricular en control masculino de 125G. Marcaje con la lectina LFA que pone de manifiesto la presencia normal de ácido siálico preferentemente en la superficie apical de las células neuroepiteliales (flecha). C y D. Feto control masculino de 16SG. C. Hematoxilina-eosina. D. Inmunocitoquímica contra nestina. La nestina pone de manifiesto las prolongaciones basales de las células de la glía radial (flecha). El inserto en D representa un detalle.

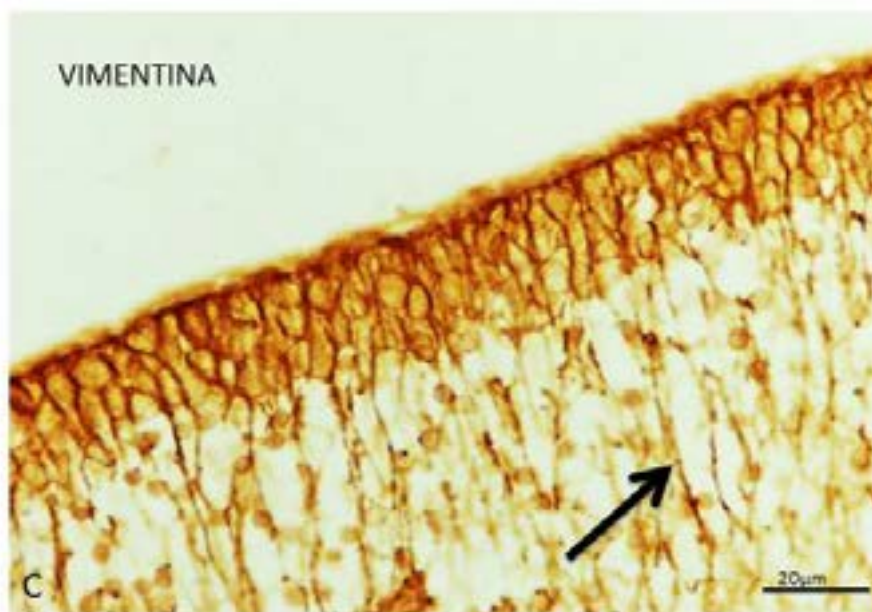
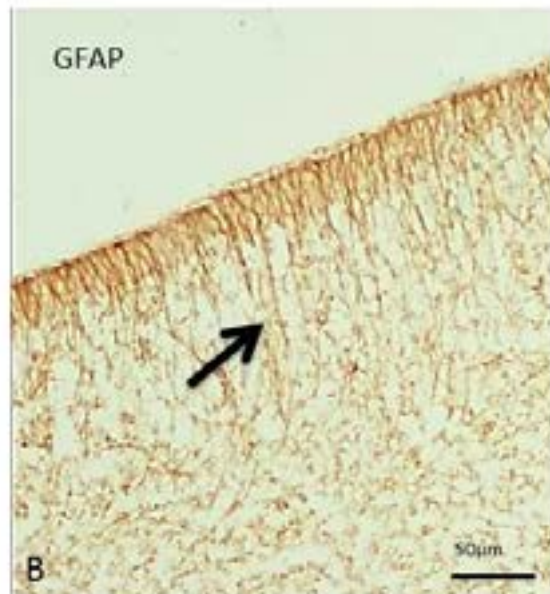
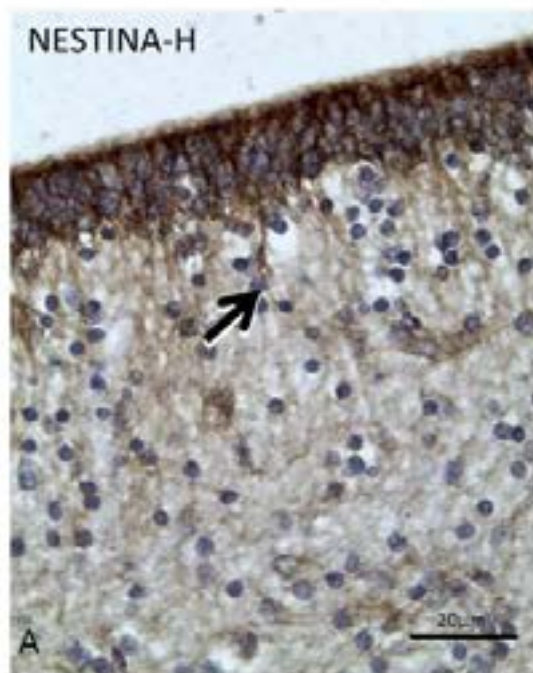


Lámina 2. Feto control masculino de 16SG. A. Inmunocitoquímica contra nestina y tinción nuclear con hematoxilina. B y C. Inmunocitoquímica contra GFAP (B) y vimentina (C). Las prolongaciones basales de las células de la glía radial aparecen marcadas (flechas).

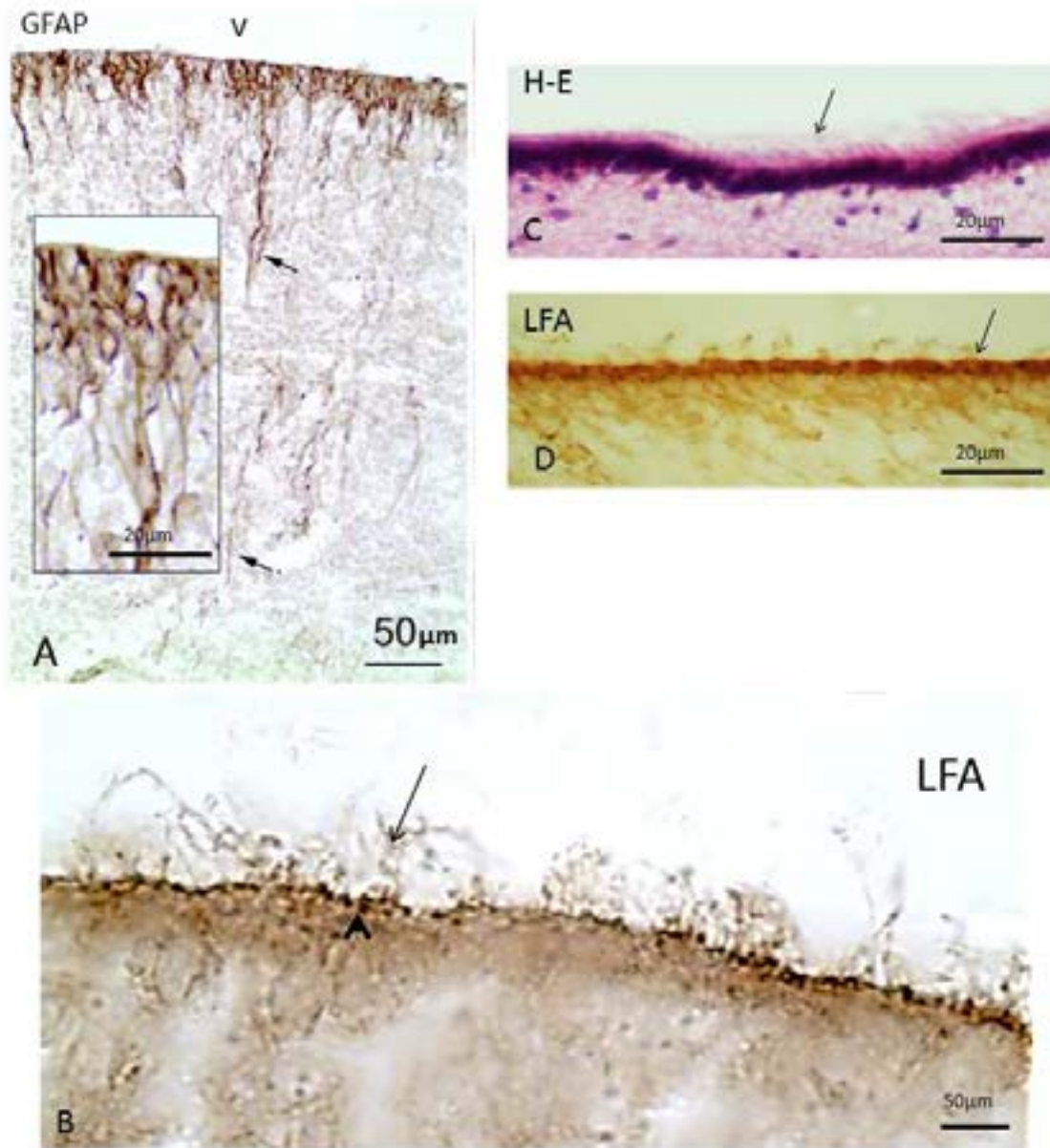


Lámina 3. A y B. Superficie ventricular de un feto control masculino de 23SG. A. Inmunomarcaje con GFAP. Se aprecia que todavía algunas células expresan GFAP. Las prolongaciones basales de la glía radial aparecen marcadas (flechas). El inserto en A muestra un detalle. B. El marcaje con LFA pone de manifiesto el ácido siálico presente en la superficie ependimaria apical (cabeza de flecha). Se aprecian penachos de cilios (flecha). C y D. Superficie ventricular de feto control masculino de 37SG con hematoxilina-eosina (C) y marcaje con LFA (D). Las flechas indican los cilios.

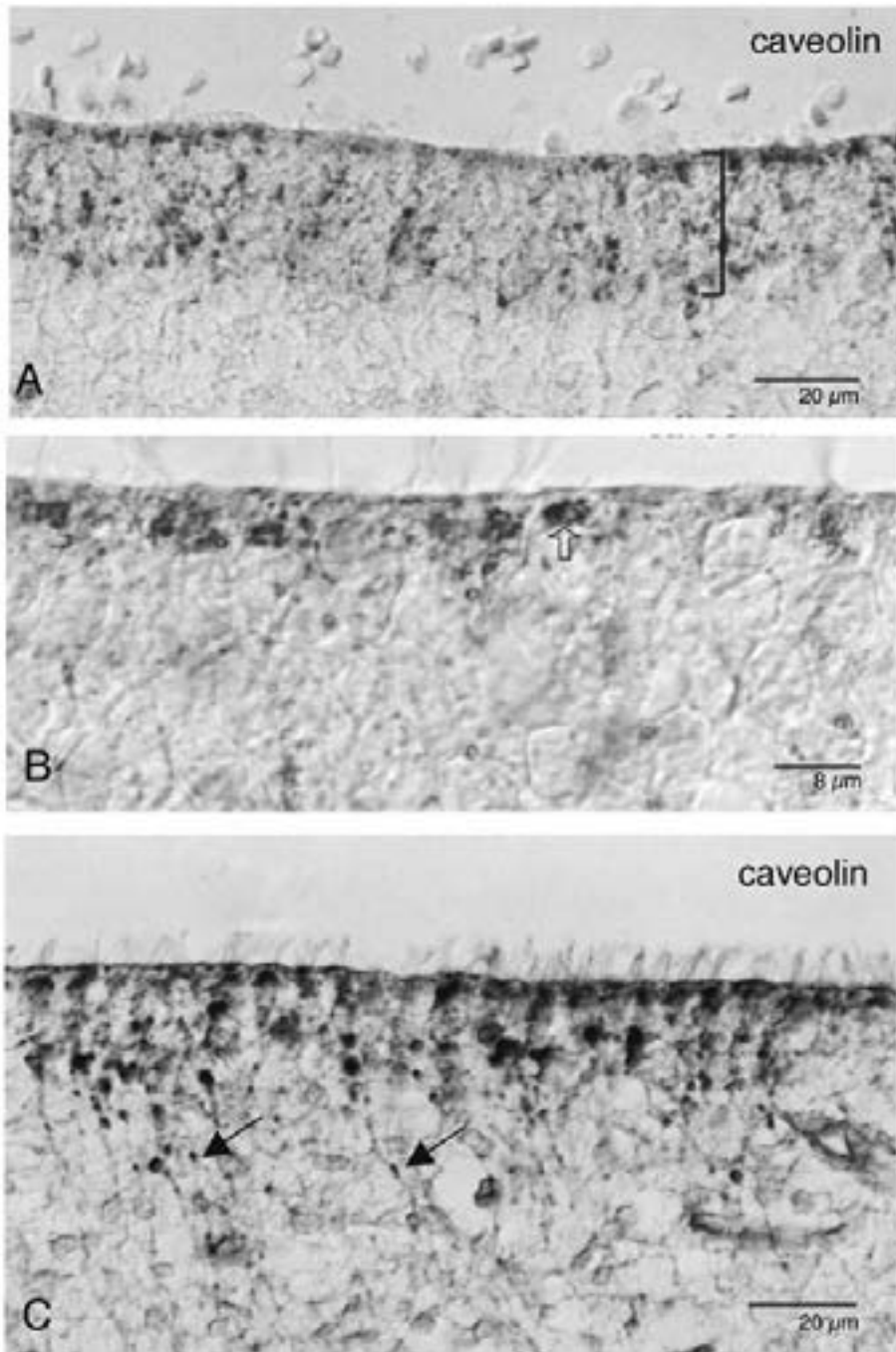


Lámina 4. Pared de los ventrículos laterales con inmunohistoquímica contra caveolina-1. A. Feto no hidrocefálico de 16SG. En el neuroepitelio, donde no se aprecian penachos de células ependimarias maduras es reactivo (corchete). B. Feto hidrocefálico de 31SG. Aparecen algunos penachos de células ependimarias maduras y el inmunomarcaje cambia (flecha blanca). C. En el epéndimo maduro, aparece inmunorreacción en el cuerpo celular y en sus prolongaciones basales (flechas).

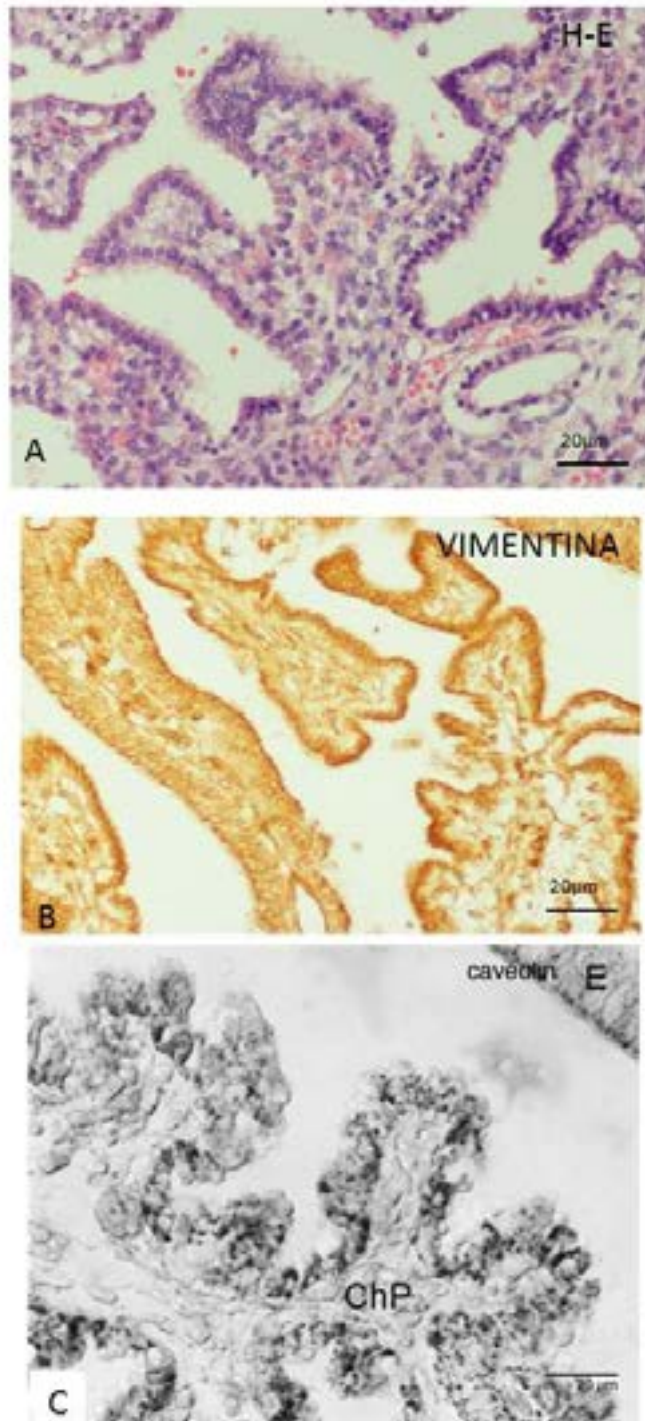


Lámina 5. Plexos coroideos de control masculino de 16SG. Hematoxilina eosina (A), e inmunohistoquímica con anti-vimentina (B) y con anti-caveolina-1 (C). E: epéndimo inmaduro.



Lámina 6. Feto control masculino de 16SG. A. Se muestra el acueducto de Silvio. Inmunomarcaje para vimentina.

5.2 Alteraciones patológicas en las paredes ventriculares

La hidrocefalia en el encéfalo produce una dilatación del sistema ventricular que va acompañado de un adelgazamiento cortical, tal y como se puede apreciar en la lámina 7, correspondiente a un caso de 16SG. Este caso tuvo diagnosticada hidrocefalia en un contexto sindrómico (baja implantación de las orejas, nariz en silla de montar y pliegue nugal aumentado), donde como en el caso mostrado, en ocasiones el cerebelo es de pequeño tamaño (lámina 7 D).

Los plexos coroideos de los casos con hidrocefalia, no mostraron diferencias apreciables morfológicas ni en la expresión de caveolina-1 con respecto a los casos controles (lámina 8).

El acueducto cerebral se encontró abierto en todos los casos estudiados con hidrocefalia. En el acueducto fue posible encontrar partes donde la capa celular que cubre la ZV estaba ausente (lámina 9). Tales paredes contrastan con las opuestas donde estaba presente el neuroepitelio (lámina 9 A y B). En un caso hidrocefálico con avanzada gestación (40SG) se pudo comprobar que el acueducto de Silvio aparece en un corte coronal claramente abierto (lámina 9 C).

En la parte dorsal del acueducto de Silvio en unos de los casos hidrocefálico, fue posible observar la presencia del órgano subcomisural bajo la comisura posterior (lámina 10).

En el canal central medular de un feto humano hidrocefálico de 16SG, fue posible detectar zonas donde el epéndimo con aspecto maduro presentaba interrupciones, ocupadas por parénquima nervioso que protruye en el ventrículo (lámina 11).

La ausencia de epéndimo ha sido una característica común encontrada en todos los fetos hidrocefálicos estudiados, independientemente de cual sea el origen de la hidrocefalia. No obstante, no todo el epéndimo se encontró ausente en las paredes ventriculares, siendo difícil determinar las regiones exactas de pérdida del epéndimo.

En los fetos hidrocefálicos de edades de gestación más tempranas (16-22SG), las paredes de acueducto de Silvio y algunas zonas de los ventrículos laterales presentaron ausencia de ZV. En todos los casos, desde las más tempranas de gestación presentando un neuroepitelio germinativo (lámina 12), hasta las más maduras de gestación a pre-término con un epéndimo multiciliado (lámina 13 y 14), el aspecto de la capa celular no mostraba síntomas de encontrarse afectada por un estiramiento debido a la dilatación ventricular. En casi todos los casos se podían encontrar paredes sin epéndimo adyacentes a otras con epéndimo (lámina 13). Entre las zonas con (lámina 14 A) y sin epéndimo (lámina 14 B) era posible observar una zona de transición con una desaparición intermitente del epéndimo (lámina 14 C, D y E).

Junto con la morfología y la presencia de cilios, la expresión del marcador CD99 y de las proteínas citoesqueléticas como GFAP, nestina y vimentina en el neuroepitelio o del epéndimo maduro en los casos con hidrocefalia fue similar al de los casos controles (lámina 14). También mostraban un glicocálix apical rico en ácido siálico (lámina 14 C). La caveolina-1 en el epéndimo maduro que permanece en los casos hidrocefálicos (lámina 15 C y D) mostró un patrón de distribución similar al de los casos controles en algunas regiones. Sin embargo, en zonas adyacentes a las del denudamiento ependimario, la caveolina-1 se detectó distribuida de forma anómala por el citoplasma apical de las células ependimarias (lámina 16 A-C).

Las zonas donde el epéndimo estaba ausente mostraban en la mayoría de las ocasiones un recubrimiento formado por astrocitos. Tales astrocitos se detectaron mediante la expresión de GFAP (lámina 14 D) y vimentina (lámina 15 A y B), estando ambas proteínas también presentes en células de la glía radial (lámina 14 D), y de S100 β (lámina 16 D). Fue llamativo observar que la capa de astrocitos también expresaba ácido siálico (detectado mediante LFA) (lámina 14 C y D).

La superficie carente de epéndimo aumenta en los casos con hidrocefalia de acuerdo con el estado de mayor desarrollo fetal. Así, los fetos más maduros investigados (36-40SG) presentaron zonas sin epéndimo similares en extensión a las zonas donde permanecía el epéndimo (lámina 13).

En las zonas donde no se presentaba epéndimo fue posible detectar la acumulación de numerosas células de tipo microglia/macrófago, (lámina 17 B y C), a diferencia de lo que ocurre en las zonas donde todavía permanece el epéndimo (lámina 17 A y D).

En algunas paredes de los ventrículos laterales de los casos con hidrocefalia, las zonas sin epéndimo y con una red de astrocitos reactivos cubriendo la superficie ventricular mostraron una desorganización en la distribución de los neuroblastos de la ZSV (lámina 18).

5.3 Rosetas ependimarias

Una alteración presente en los casos con hidrocefalia, fue la presencia de rosetas cubiertas con un epéndimo multiciliado cúbico/cilíndrico. Dichas rosetas aparecen inmersas en el parénquima nervioso en las regiones que no contienen epéndimo (lámina 19 y 20).

En los fetos de avanzada gestación (40SG), las células que formaban las rosetas mostraron diferencias en las expresiones de algunos de los marcadores del epéndimo. En ellas era frecuente encontrar una mayor proporción de células GFAP positivas con largas prolongaciones basales entre las ependimarias maduras. Por contra, sus células fueron encontradas sin reacción con el anticuerpo para vimentina (lámina 20 D). Además, fue llamativo encontrar una ausencia de cadherinas en las uniones celulares (lámina 20 B y C).

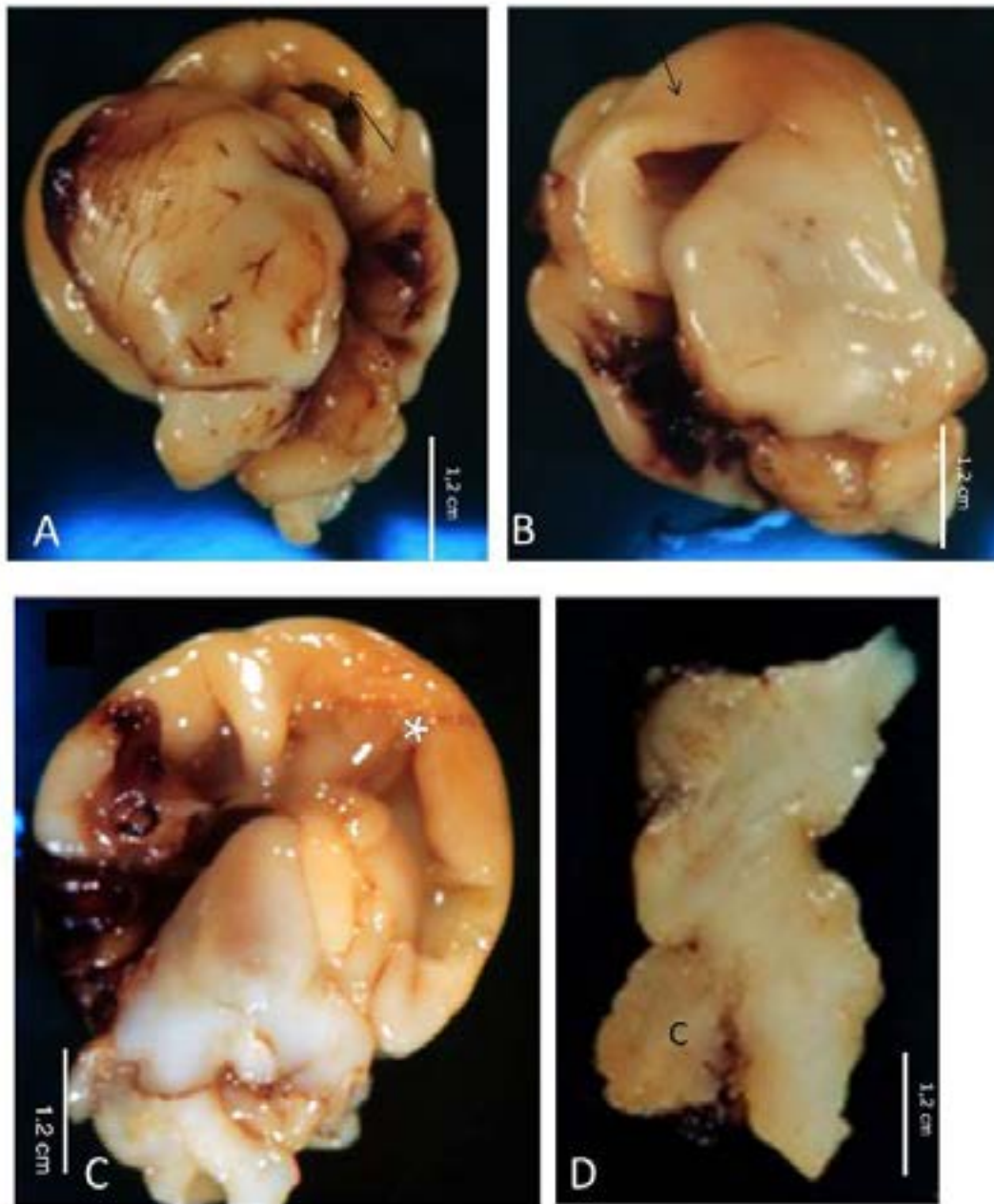


Lámina 7. SNC de un feto femenino hidrocefálico de 16SG. A, B. Aparece un importante adelgazamiento cortical (flecha en B). C. Existe una dilatación del ventrículo lateral (asterisco). D. El cerebelo (c) muestra un pequeño tamaño.

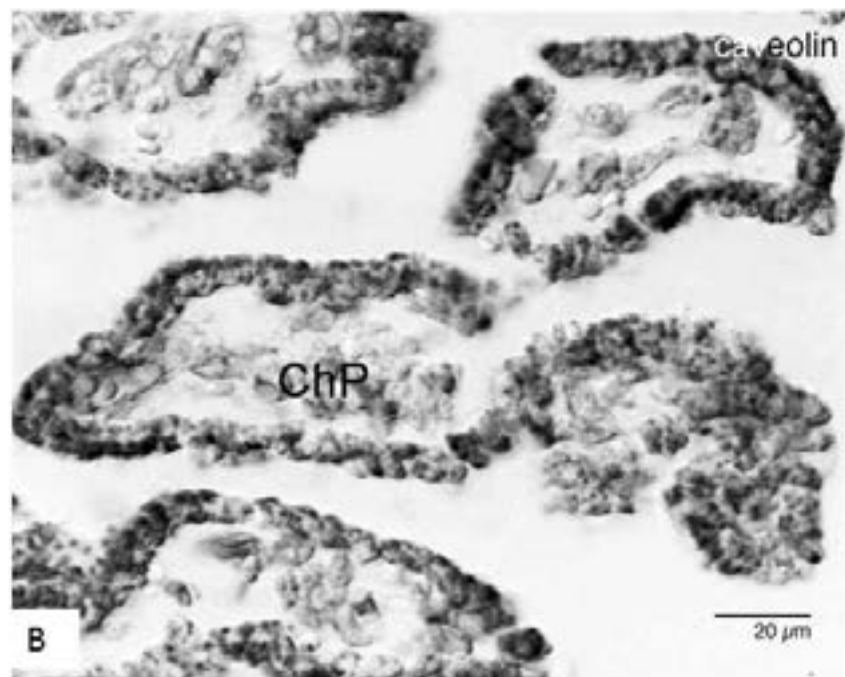
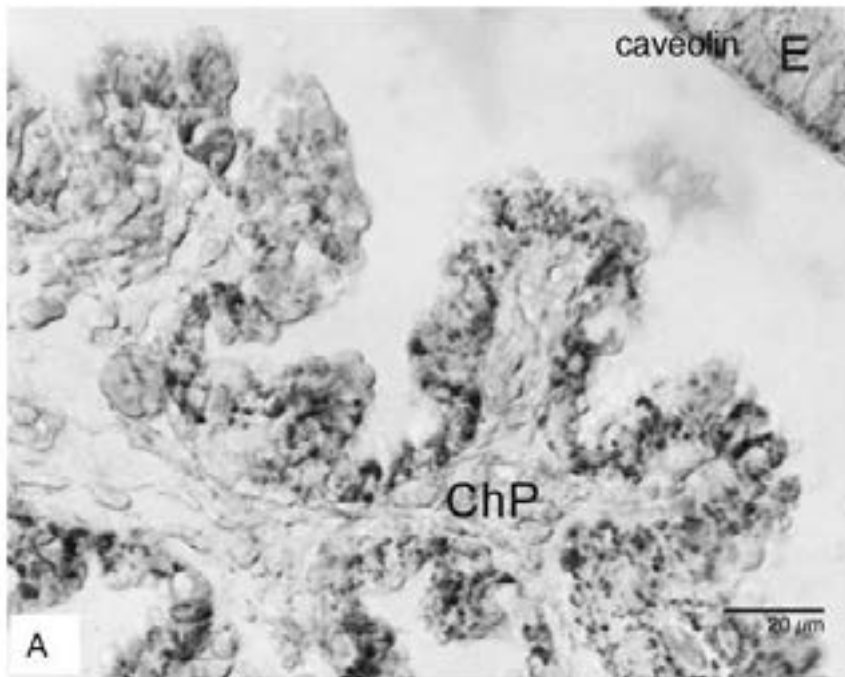


Lámina 8. Plexos coroideos (ChP). Inmunotinción con anti-caveolina-1. A Feto control masculino de 16SG. Se aprecia el epéndimo inmaduro (E). B. Plexos coroideos de un feto masculino hidrocefálico de 20SG.

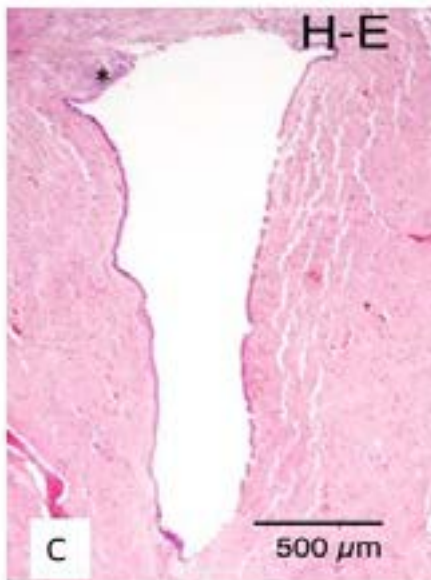
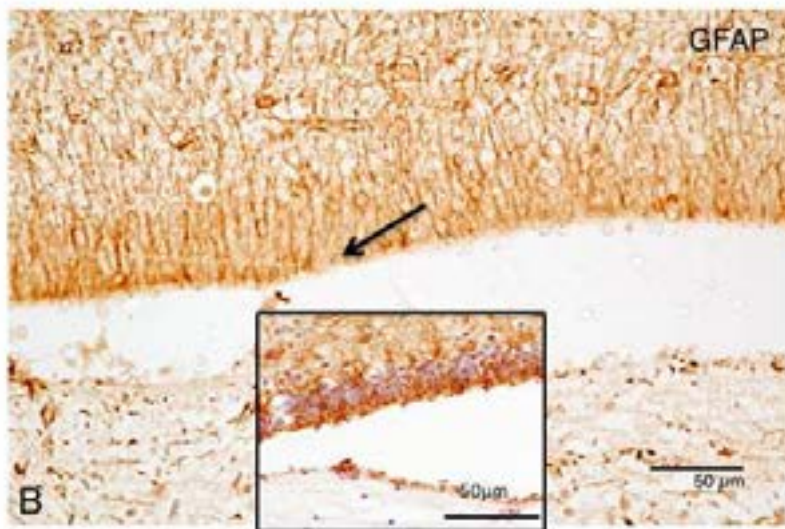
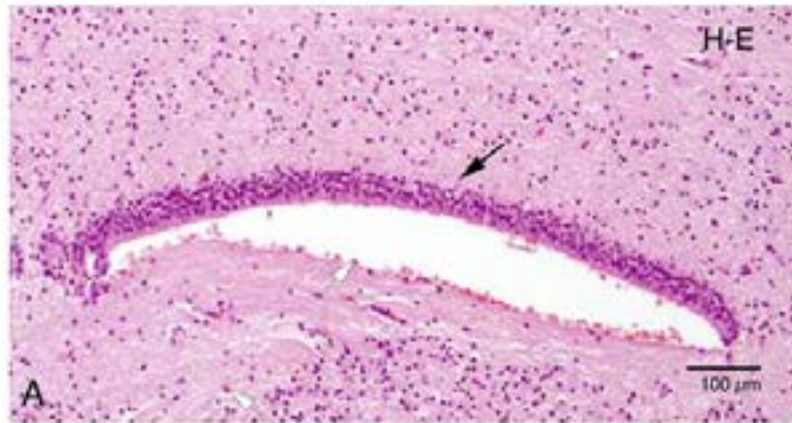
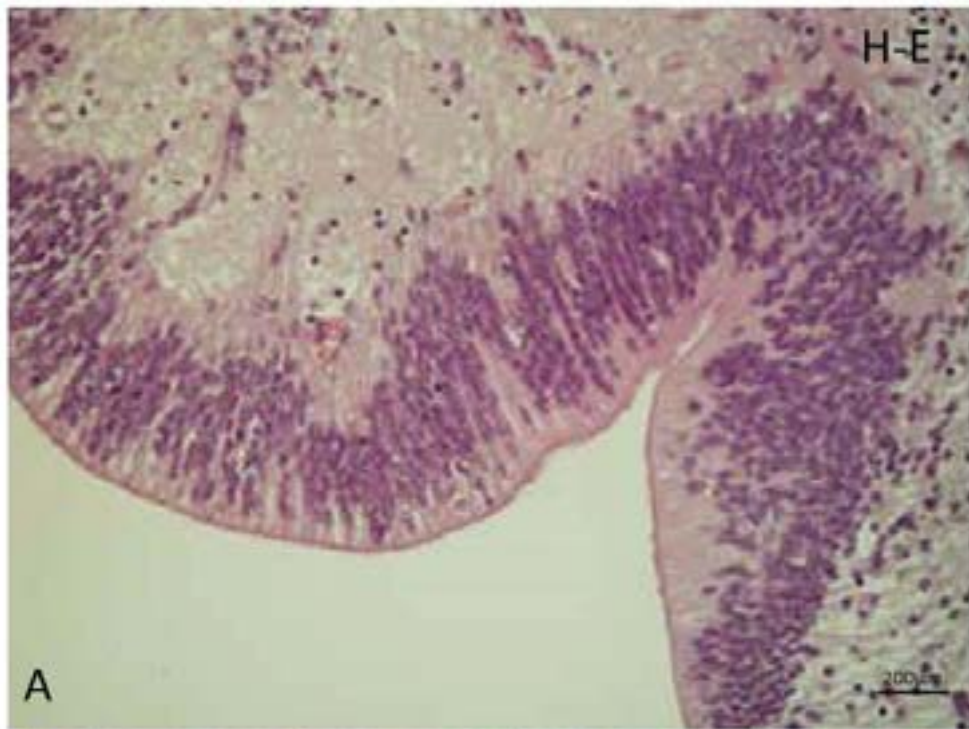
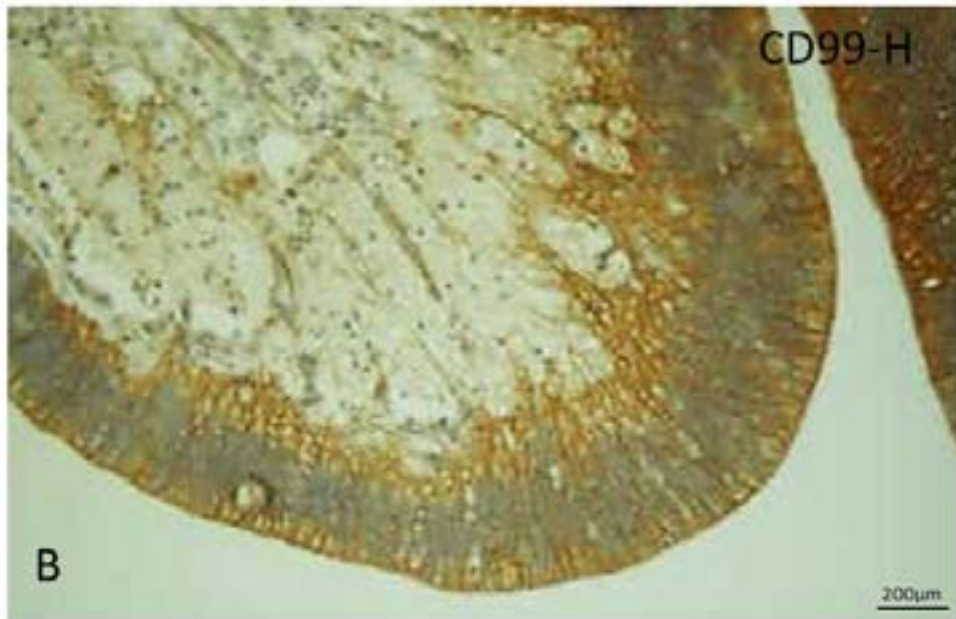


Lámina 9. Acueducto de Silvio de feto femenino hidrocefálico de 16SG. A. Hematoxilina-eosina (H-E). Aparecen opuestas una parte de pared con epéndimo (flecha negra) y otra donde está ausente (flecha blanca). B. Inmunohistoquímica contra GFAP en un corte adyacente a A. Se aprecia una de las paredes presentando células de aspecto de glía radial (flecha), que están ausentes en la opuesta. El inserto en B muestra inmunomarcaje en una sección adyacente con CD99 y tinción nuclear con hematoxilina. C. Acueducto de Silvio de feto femenino hidrocefálico de 40SG con síndrome de Potter. Hematoxilina y eosina (H-E). El asterisco muestra un fragmento de órgano subcomisural.



A



B

Lámina 10. Órgano subcomisural de un feto femenino hidrocefálico de 165G. A. Hematoxilina-eosina (H-E). B. Inmunomarcaje para CD99 y tinción nuclear con hematoxilina (H).

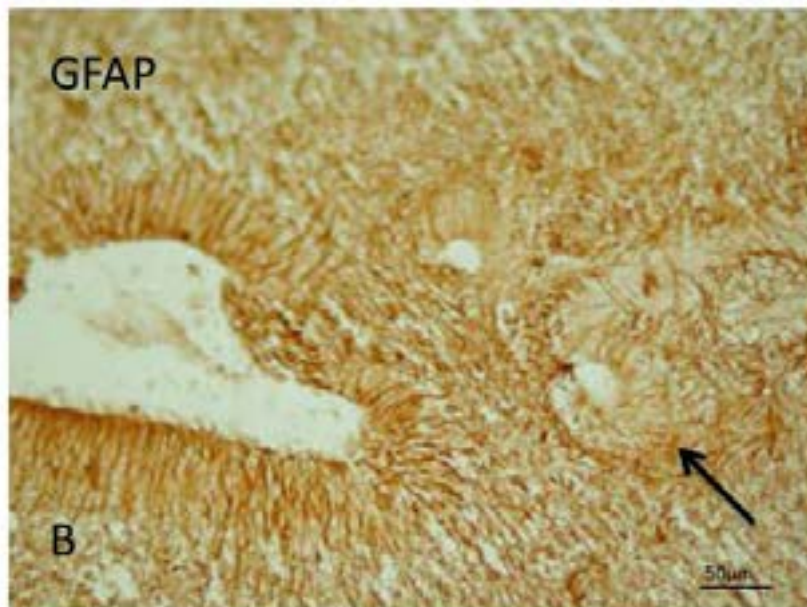
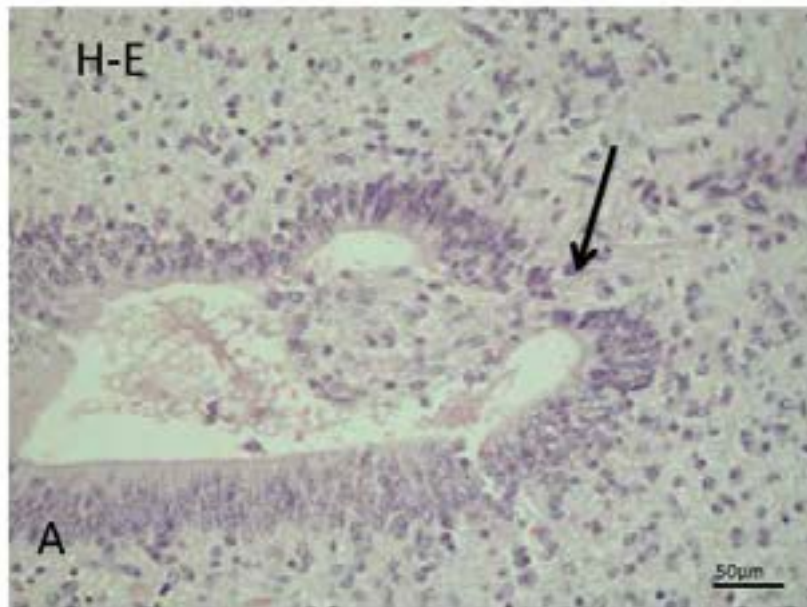


Lámina 11. Feto femenino hidrocefálico de 16SG. Canal central medular. A. Hematoxilina-eosina. La flecha señala una zona con interrupción de la ZV. B. Inmunitinción para GFAP. Se observa una alteración de la ZV con salida de células a la luz del canal central medular. La flecha indica una zona con rosetas en B.

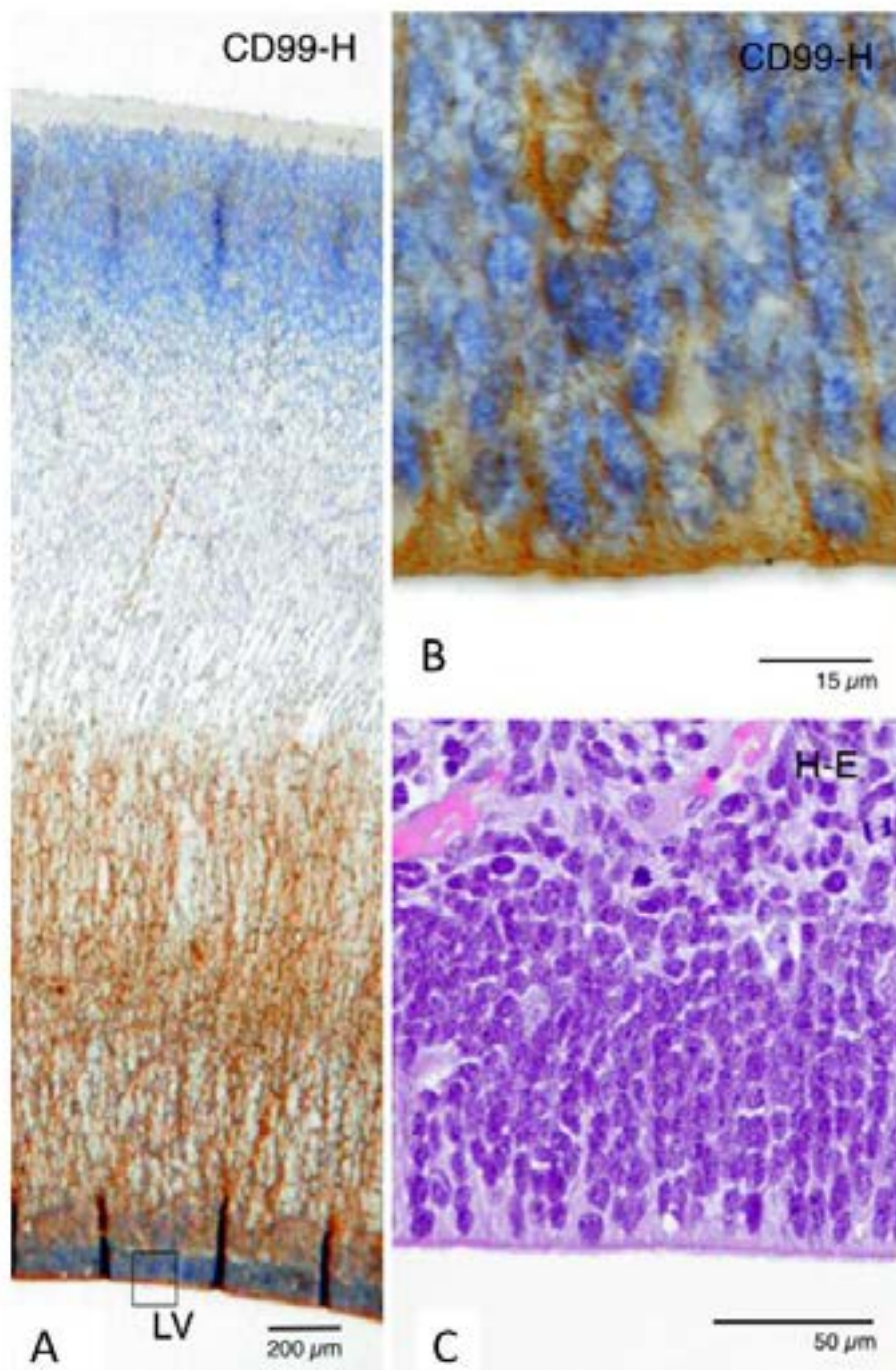


Lámina 12. Feto femenino hidrocefálico de 16SG. A, B. Pared de un ventrículo lateral con inmunohistoquímica para CD99 y hematoxilina como tinción nuclear (H). B corresponde a un detalle de la zona recuadrada en A. C. Detalle de la superficie ventricular con hematoxilina-eosina (H-E).

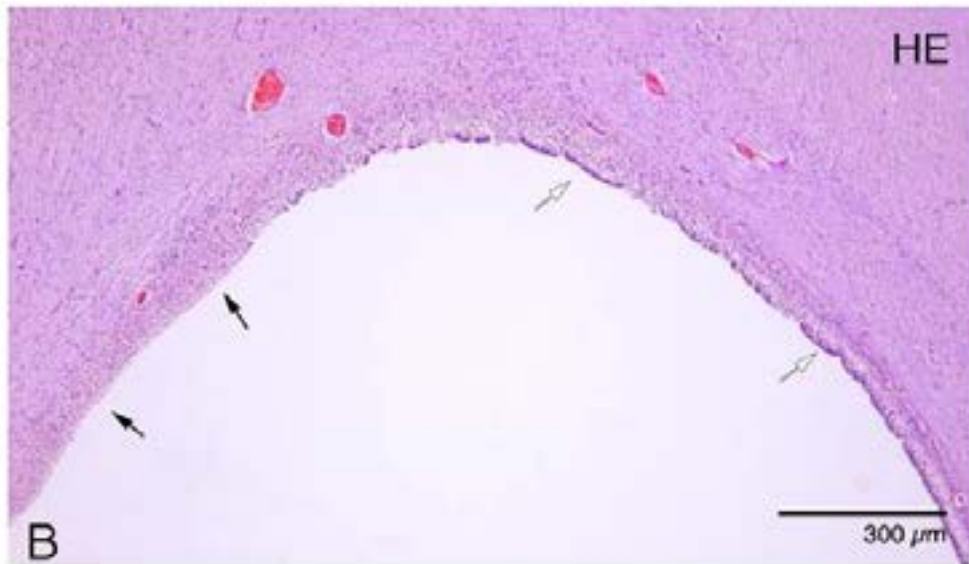
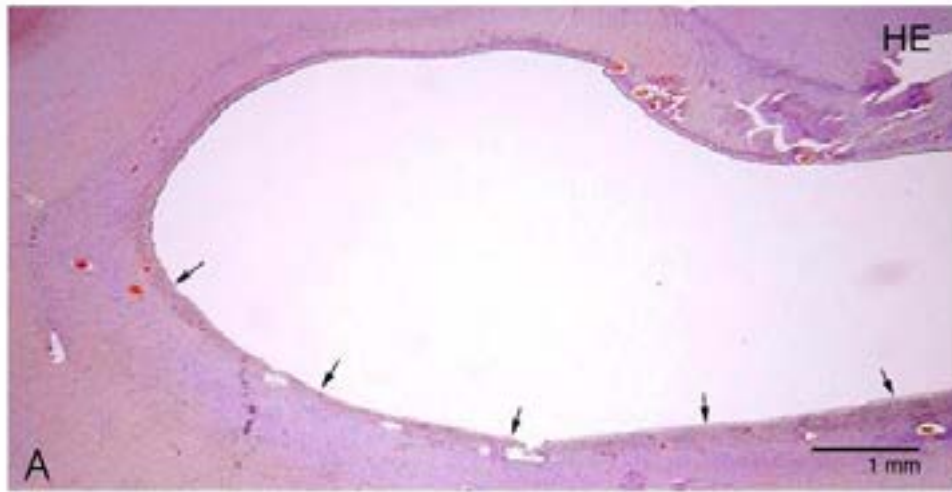


Lámina 13. Sección del ventrículo lateral de un feto femenino hidrocefálico de 40SG. Hematoxilina-eosina (HE). B es un detalle de A. Aparecen zonas que conservan la capa ependimaria (flechas blancas) y zonas sin epéndimo (flechas negras).

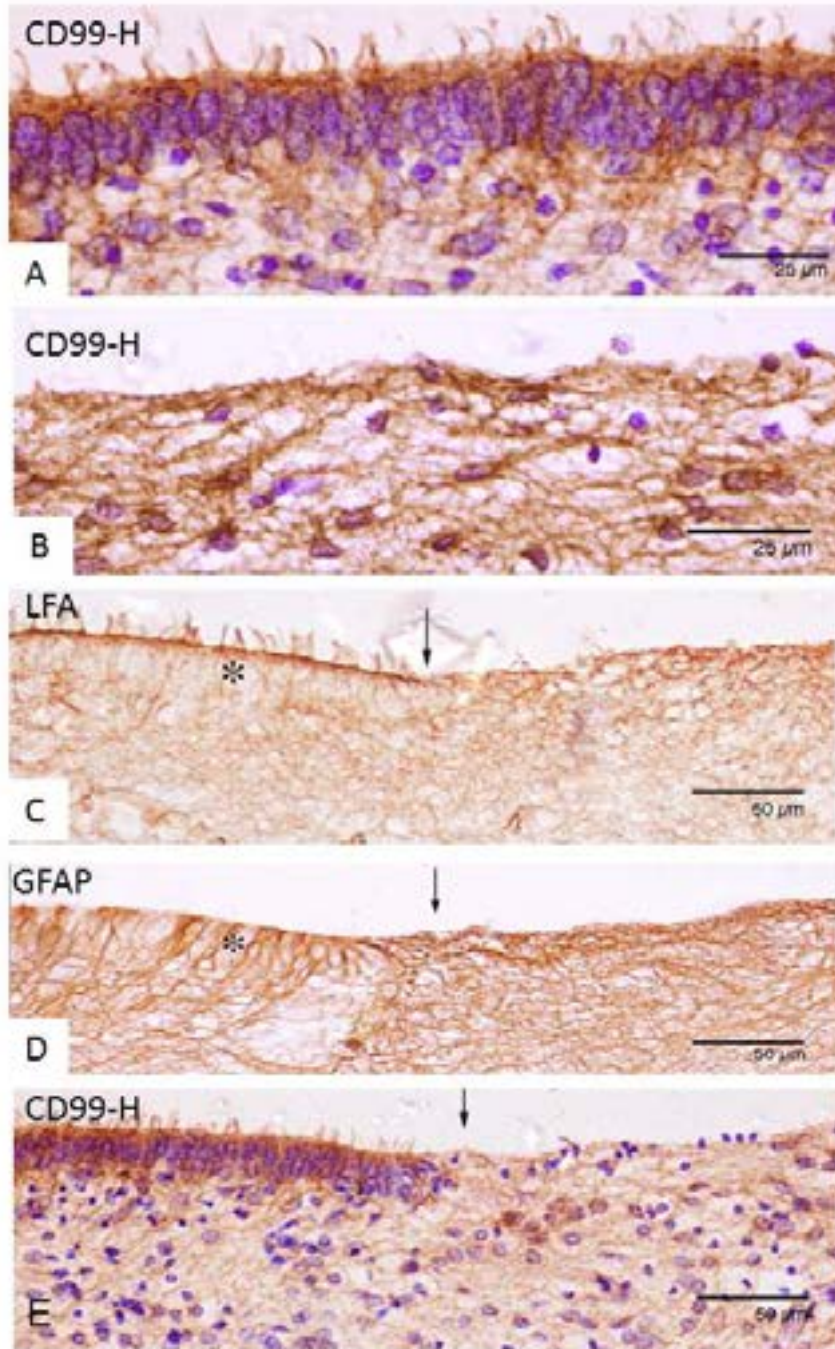


Lámina 14. Ventriculo lateral de un feto femenino hidrocefálico de 36SG. Inmunohistoquímica para CD99 (A, B y E) y tinción nuclear con hematoxilina (H). C y D. Marcaje para LFA (C) y GFAP (D). A. Región donde permanece el epéndimo multiciliado. B. Superficie ventricular sin epéndimo. Las zonas que conservan la ZV están marcadas con un asterisco. En la ZV aparecen células ependimarias multiciliadas con marcaje apical mediante LFA. En la ZV todavía aparecen algunas células con GFAP lo que pone de manifiesto células de la glía radial. La superficie sin ZV muestra una capa de células fuertemente marcadas con GFAP, correspondientes a astrocitos reactivos. Las flechas verticales indican la frontera entre ambas zonas, donde se aprecian la ZV (izquierda) y la reacción astrocitaria (derecha)

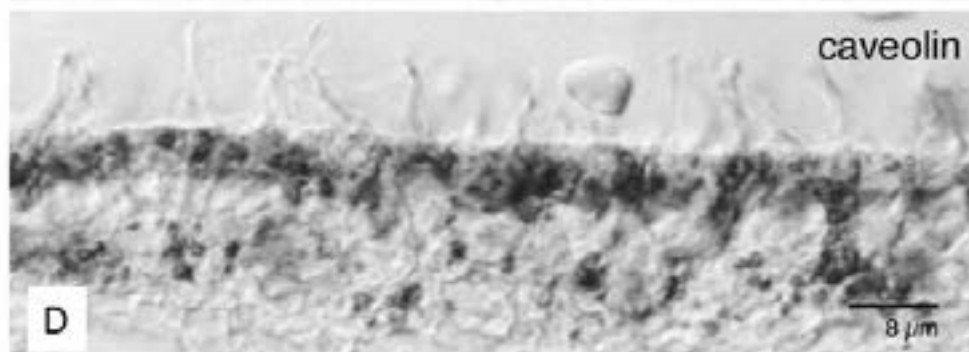
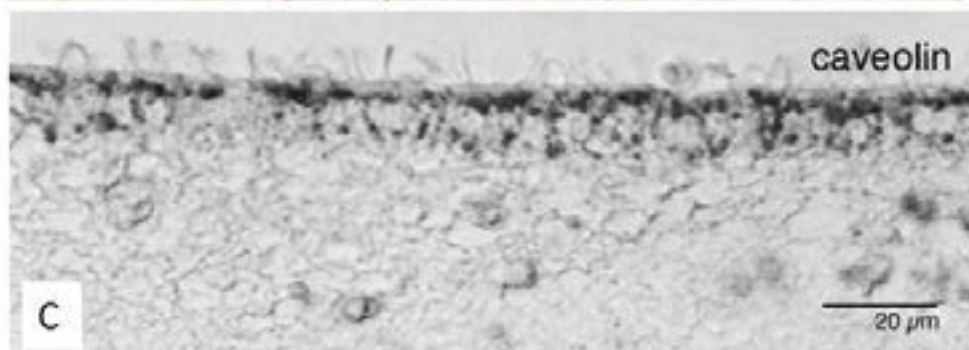
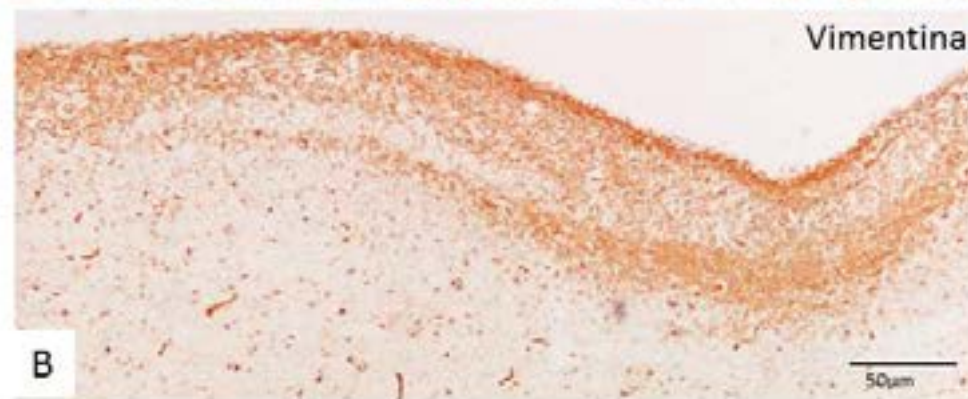
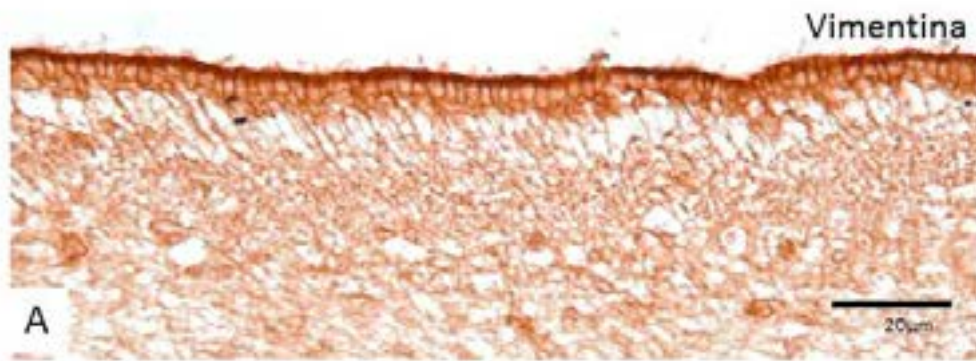


Lámina 15. A. Pared de ventrículo lateral de feto femenino hidrocefálico de 365G con inmunomarcaje para vimentina. B. Pared del ventrículo lateral de un feto masculino de 315G con mismo inmunomarcaje. C y D. Pared de ventrículo lateral de un feto femenino hidrocefálico de 405G con inmunomarcaje contra caveolina-1.

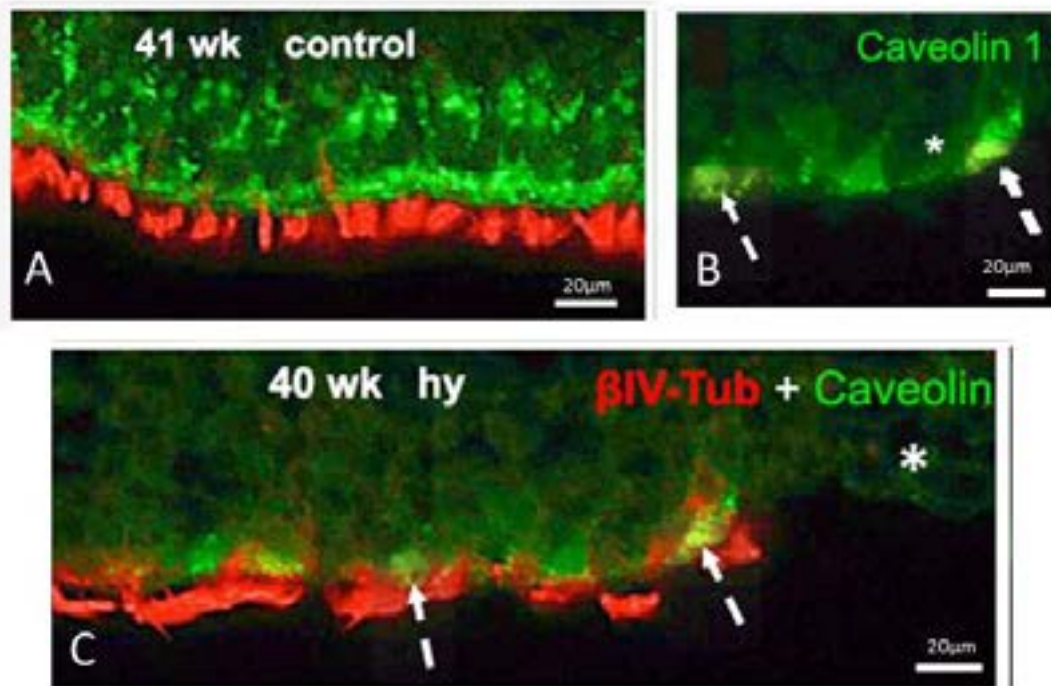


Lámina 16. Expresión de caveolina-1 en el epéndimo de casos controles e hidrocefálicos. Doble inmunofluorescencia para tubulina beta IV (rojo) caveolina 1 (verde). A. Feto control masculino de 41 SG. B, C. Feto femenino hidrocefálico de 40 SG. Cerca de la zona próxima a la pérdida de epitelio endimario, células endimarias (asteriscos) muestran expresión anormal de en el citoplasma de caveolina-1 (flechas discontinuas).

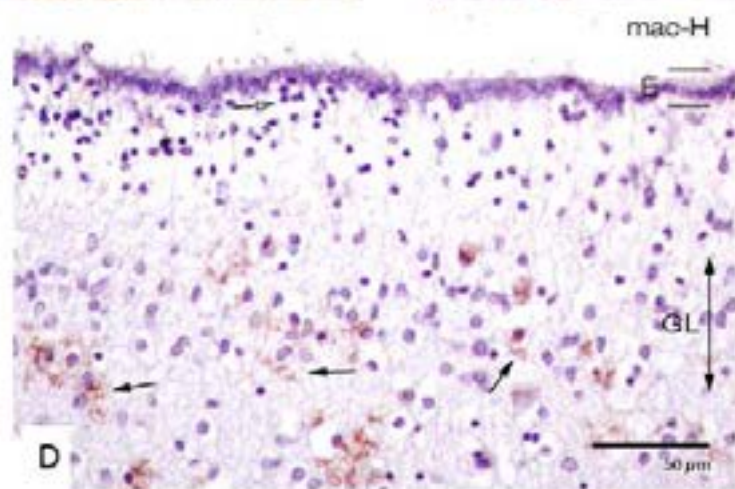
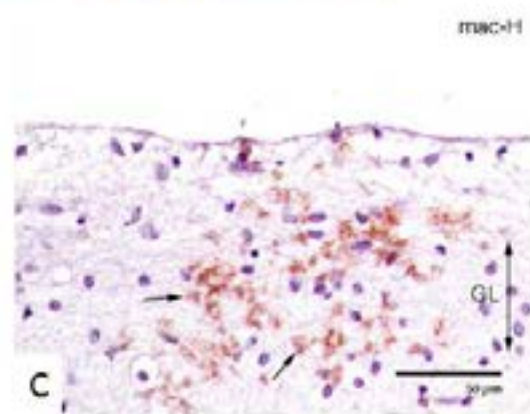
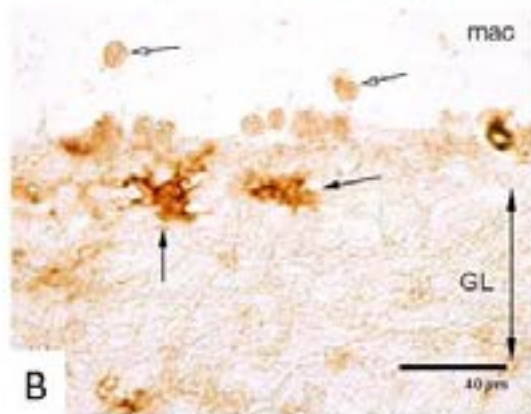
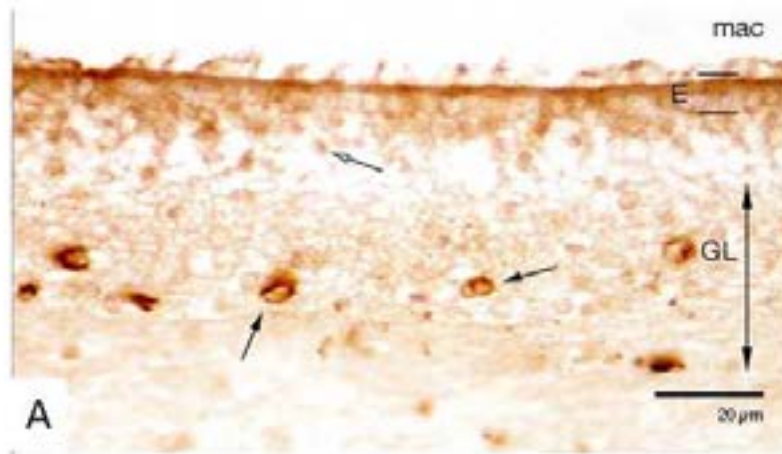


Lámina 17. Inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para macrófagos humanos (mac) y tinción nuclear con hematoxilina (H). A y B. Ventriculo lateral de un feto femenino hidrocefálica de 40SG. Las flechas negras señalan a las células endoteliales inmunomarcadas con este anticuerpo. A. Zona con epéndimo. Las flechas blancas señalan los neuroblastos en la ZSV. B. Zona carente de epéndimo. Las flechas negras señalan a células inmunorreactivas con aspecto microglial y las blancas a células no reactivas en la luz ventricular. C y D. Ventriculo lateral de un feto femenino hidrocefálica de 36SG. Zonas con (D) y sin (C) epéndimo. La flecha blanca en D señala neuroblastos inmunonegativos. Las flechas negras señalan las células inmunorreactivas. GL: delimita la región ocupada por la capa de astrocitos en la ZSV.

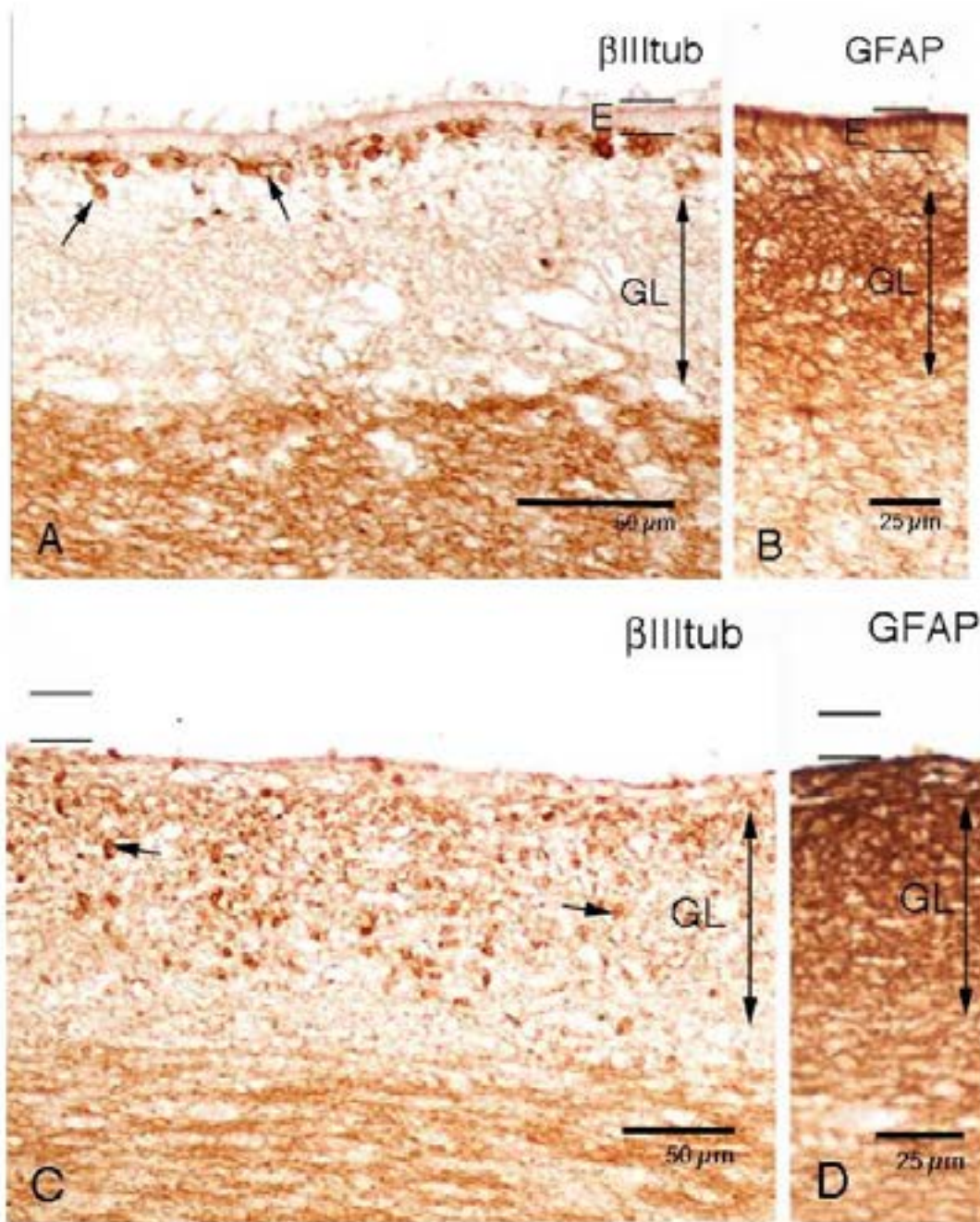


Lámina 18. Ventriculo lateral de feto femenino hidrocefalico de 40SG. Región con epéndimo (E) e inmunomárcaje para tubulina beta III (A) y GFAP (B) en secciones consecutivas. Región adyacente a la mostrada en A y B carente de epéndimo (zona que debería estar ocupada por la región entre barras) e inmunomárcaje para tubulina beta III (C) y GFAP (D) en secciones consecutivas. El epéndimo maduro (GFAP+) ocupa la ZV. La ZSV contiene una red de astrocitos (GL). Entre ambas se encuentra una región delgada que contiene neuroblastos tubulina beta III+ (flechas en A). La zona sin epéndimo está cubierta por una capa de astrocitos reactivos y muestra una desorganización de los neuroblastos (flechas en C).

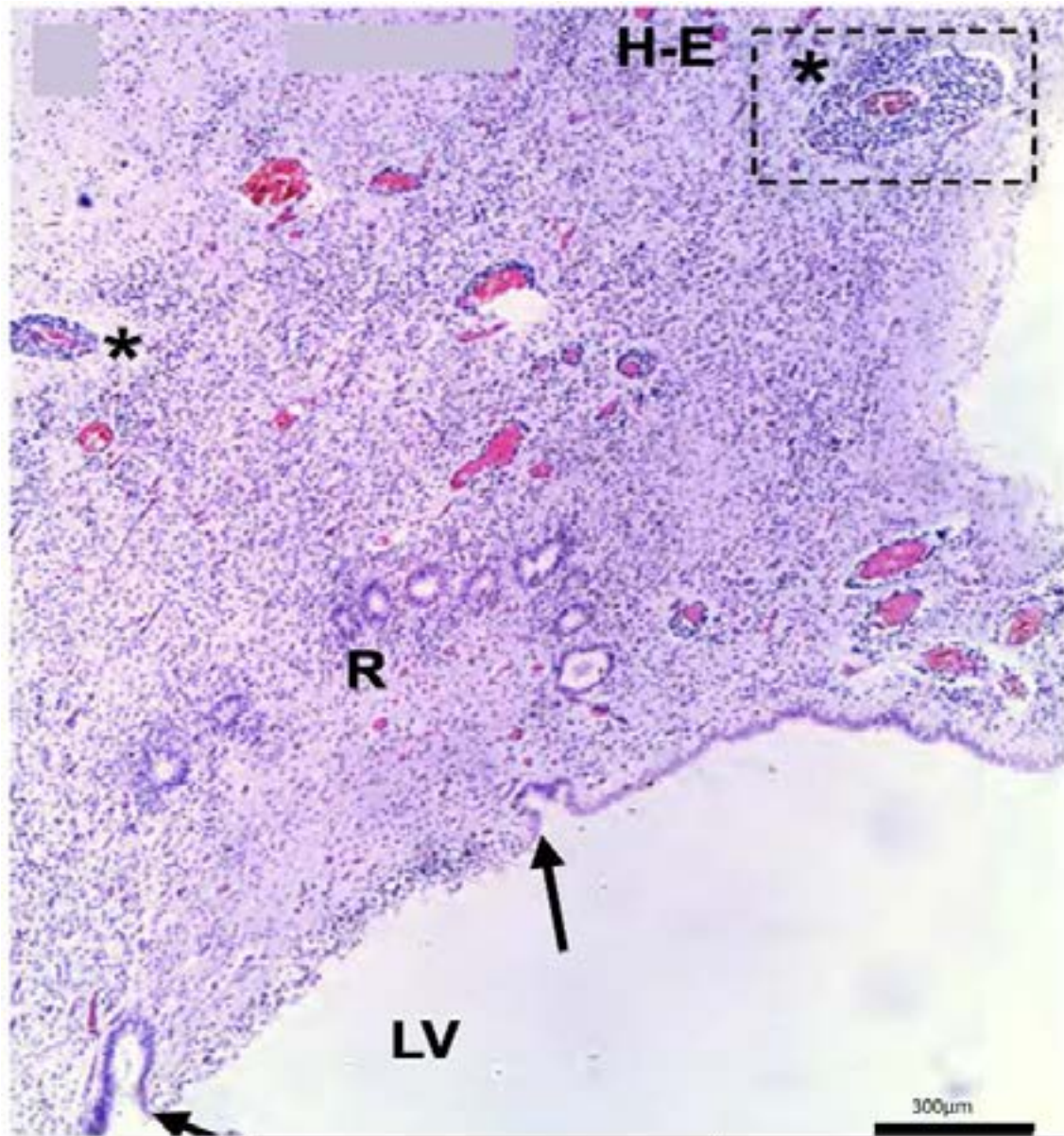


Lámina 19. Superficie ventricular de feto femenino hidrocefálico de 405G con hematoxilina-eosina con una amplia zona que ha perdido el epitelio ependimario (especio entre flechas). LV, (luz ventricular). R, marca las rosetas ependimarias que aparecen en las zonas sin epéndimo. Los asteriscos y el cuadro con marco discontinuo marcan agrupamientos de neuroblastos alrededor de un capilar.

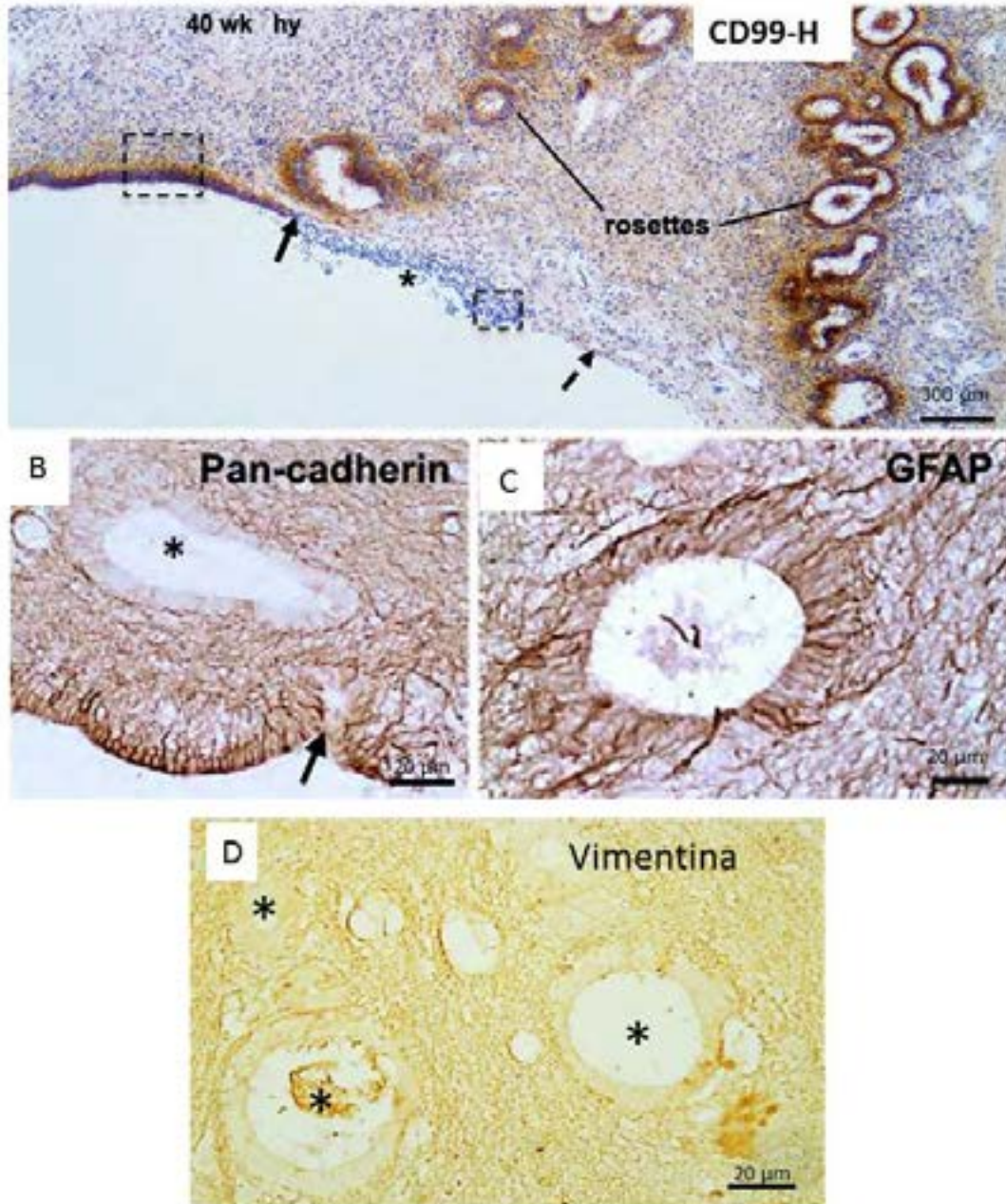


Lámina 20. A. Superficie ventricular de un feto femenino hidrocefálico de 40SG. Inmunohistoquímica contra CD99 y tinción de fondo con hematoxilina. Se muestra una región con epéndimo (CD99+) adyacente a una región sin epéndimo. La flecha continua señala el límite entre ambos. La flecha discontinua muestra una zona sin epéndimo. El recuadro muestra una región con epéndimo. Se aprecian rosetas endimarias en la región carente de epéndimo. El asterisco señala una región sin epéndimo y con localización anormal de neuroblastos. B, C y D: Inmunohistoquímica en el mismo caso de A contra pan-cadherina (B), GFAP (C) y vimentina (D). La capa de células de aspecto endimario que cubre las rosetas (asteriscos) presenta un patrón de marcaje diferencial con respecto al epéndimo que carece de la expresión de cadherinas y vimentina. En cambio, el epéndimo de las rosetas presenta células GFAP inmunorreactivas con aspecto de glia radial.

5.4 Características de la barrera astroglial en las zonas sin epéndimo

Una de las principales alteraciones patológicas encontradas en los fetos con las diferentes formas de hidrocefalia, ha sido la presencia de una reacción astrocitaria que cubre gran parte de las superficies ventriculares sin epéndimo (lámina 21), ocupando por tanto la ZV en sustitución del epéndimo. Además de la expresión de GFAP (lámina 18 B y D y lámina 21 A-C), su marcaje con vimentina (lámina 15 A y B y lámina 21 D) pone de manifiesto su carácter reactivo, ya que dicha proteína no estaba presente en los astrocitos de los casos controles.

Tales astrocitos reactivos se encontraron expresando, tanto en sus cuerpos celulares como en sus prolongaciones celulares, el canal acuoso acuaporina 4. Esta distribución del canal acuoso es distinta (lámina 22) a la observable en los astrocitos no reactivos presentes en otras regiones corticales, donde sólo aparece en los pies perivasculares, y en los astrocitos de los casos controles. La distribución de acuaporina 4 en los astrocitos reactivos contrasta con la presente en el epéndimo en las zonas donde permanece. Así en el epéndimo maduro aparece en sus dominios laterobasales (lámina 22 A).

Los astrocitos reactivos en los casos con hidrocefalia presentaron marcaje contra el antígeno EEA1 de endosomas tempranos a lo largo de todo su cuerpo celular y de sus prolongaciones celulares (lámina 23 A y B). Esta reacción no aparece como tal en los astrocitos en el interior del parénquima nervioso de los casos con hidrocefalia. En el epéndimo que permanece en los casos con hidrocefalia, la distribución de los endosomas tempranos marcados es en su citoplasma apical (lámina 23 B), al igual que en el epéndimo de los casos controles (lámina 23A). Al igual que con la acuaporina 4 y el antígeno EEA1, su distribución fue diferente a la de los astrocitos no reactivos (lámina 23).

Los astrocitos reactivos periventriculares y los presentes en el parénquima cortical en regiones más profundas de los casos con hidrocefalia mostraron un marcaje con el anticuerpo con TNF α (lámina 24, 25 y 26). Los astrocitos de los controles no mostraron dicha inmunorreacción (lámina 24 A).

Mediante innumarajes para detectar GFAP y TNF α (lámina 24 y 25) fue posible detectar que la barrera glial también expresaba TNF α en los casos con hidrocefalia (lámina 24 C y D y lámina 25) tanto en las zonas más próximas a la superficie ventricular como en las zonas más profundas del parénquima cerebral (lámina 25 B y C).

Mediante dobles marcajes se ha estudiado la co-expresión de TNF α y GFAP en zonas sin epéndimo mostrando colocalización de ambos marcadores (lámina 26 A y B). Se ha estudiado también, mediante el marcador Iba-1 expresado por las células de la microglia, la colocalización con TNF α e Iba-1 para determinar si estas células que expresan TNF α son realmente gliales como se confirma en la lámina 26 C y D.

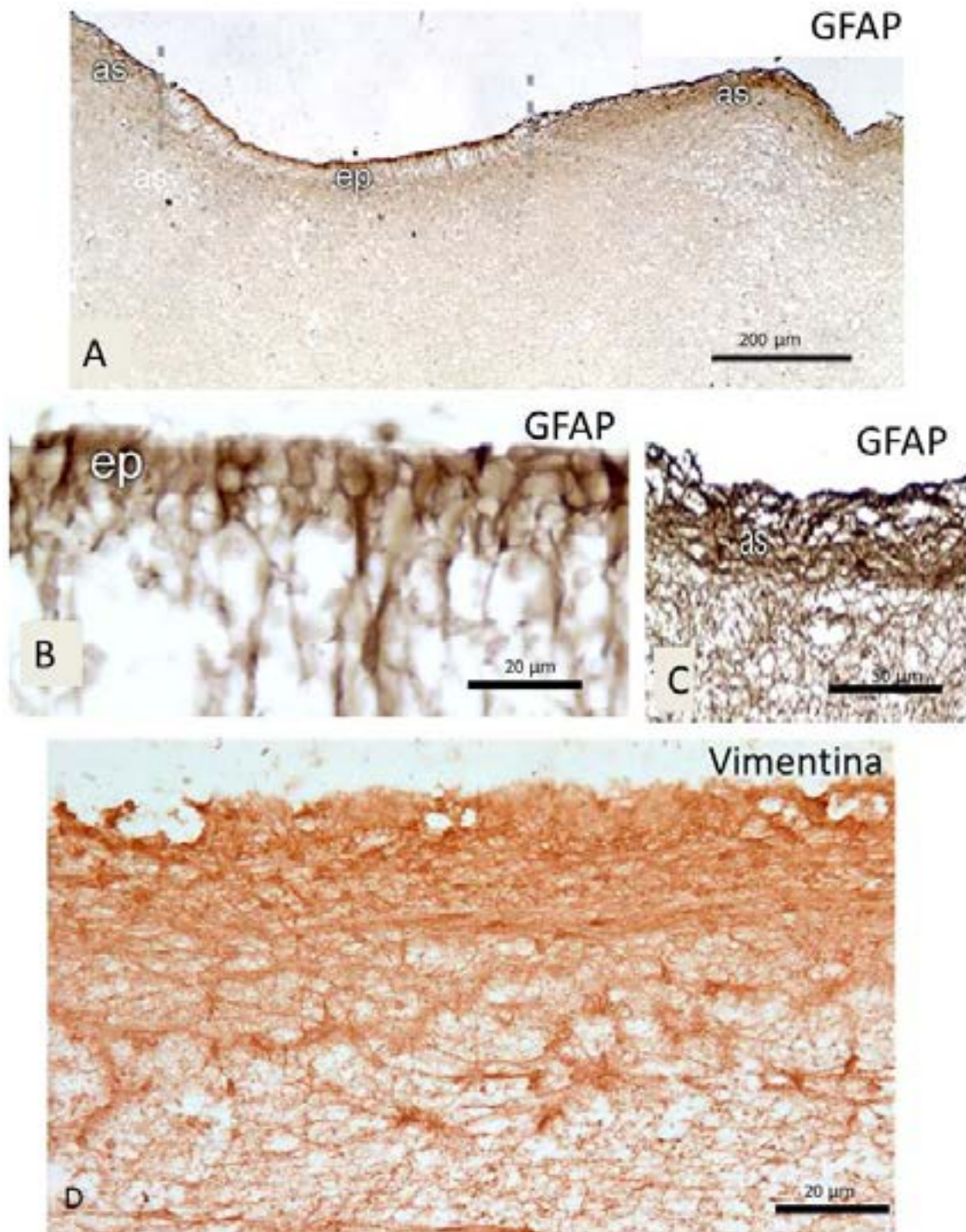


Lámina 21. A. Ventriculo lateral de un feto femenino hidrocefálico de 40SG. B y C. Detalles de zonas que aparecen en A con epéndimo (ep) y con astrocitos formando una nueva barrera (as). D. Ventriculo lateral de feto varón de 39SG polimarformado con inmunomarcaje de los astrocitos reactivos mediante vimentina en la ZV sin epéndimo.

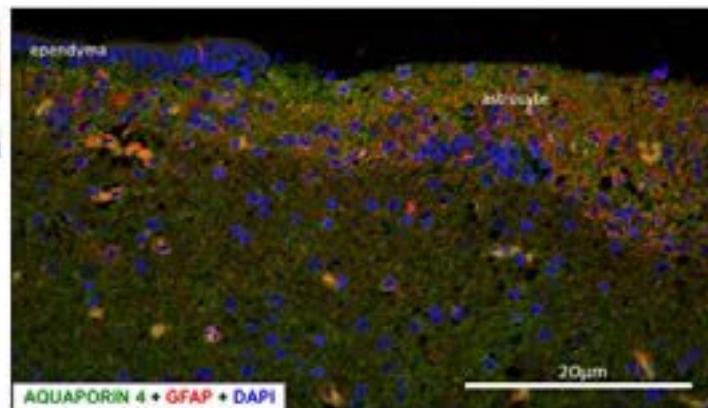
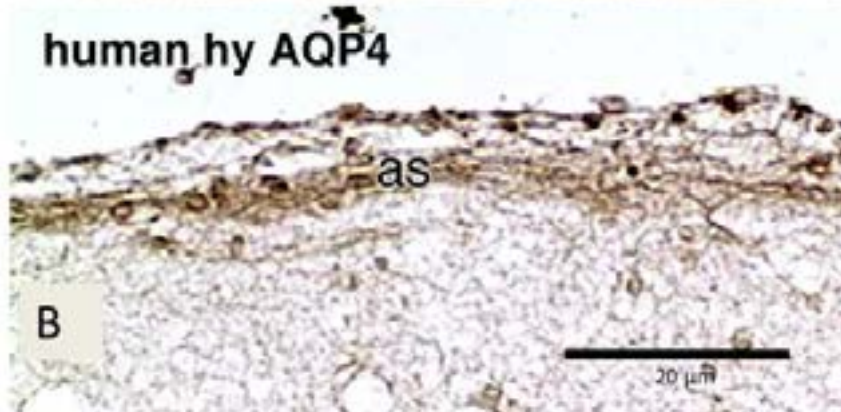
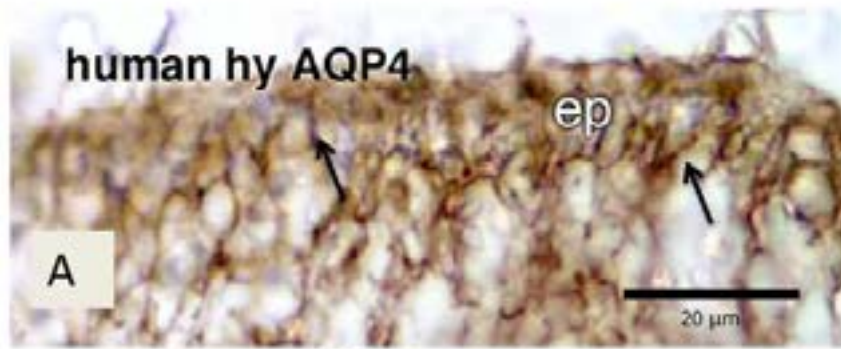


Lámina 22. Ventriculo lateral de feto femenino hidrocefálico de 40SG. A-C. Inmunohistoquímica contra acuaporina 4 (AQP4) mostrando una zona donde permanece epéndimo (ep) en A, y otra adyacente sin epéndimo y con reacción astrocitaria (as) en B y C. En el epéndimo que permanece la marca está preferentemente en los dominios membranales laterobasales (flechas en A). En los astrocitos reactivos la acuaporina 4 se detecta tanto en su porción en contacto con el LCR (cabeza de flecha en C) como en el cuerpo celular (flecha en C) y en sus prologaciones celulares. D. Ventriculo lateral de un feto masculino hidrocefálico de 23SG. Inmunofluorescencia con doble marcaje para GFAP (rojo) y acuaporina 4 (verde). Tinción nuclear mediante DAPI (azul). Se muestra una zona con epéndimo (izquierda) adyacente a una con reacción astrocitaria (derecha).

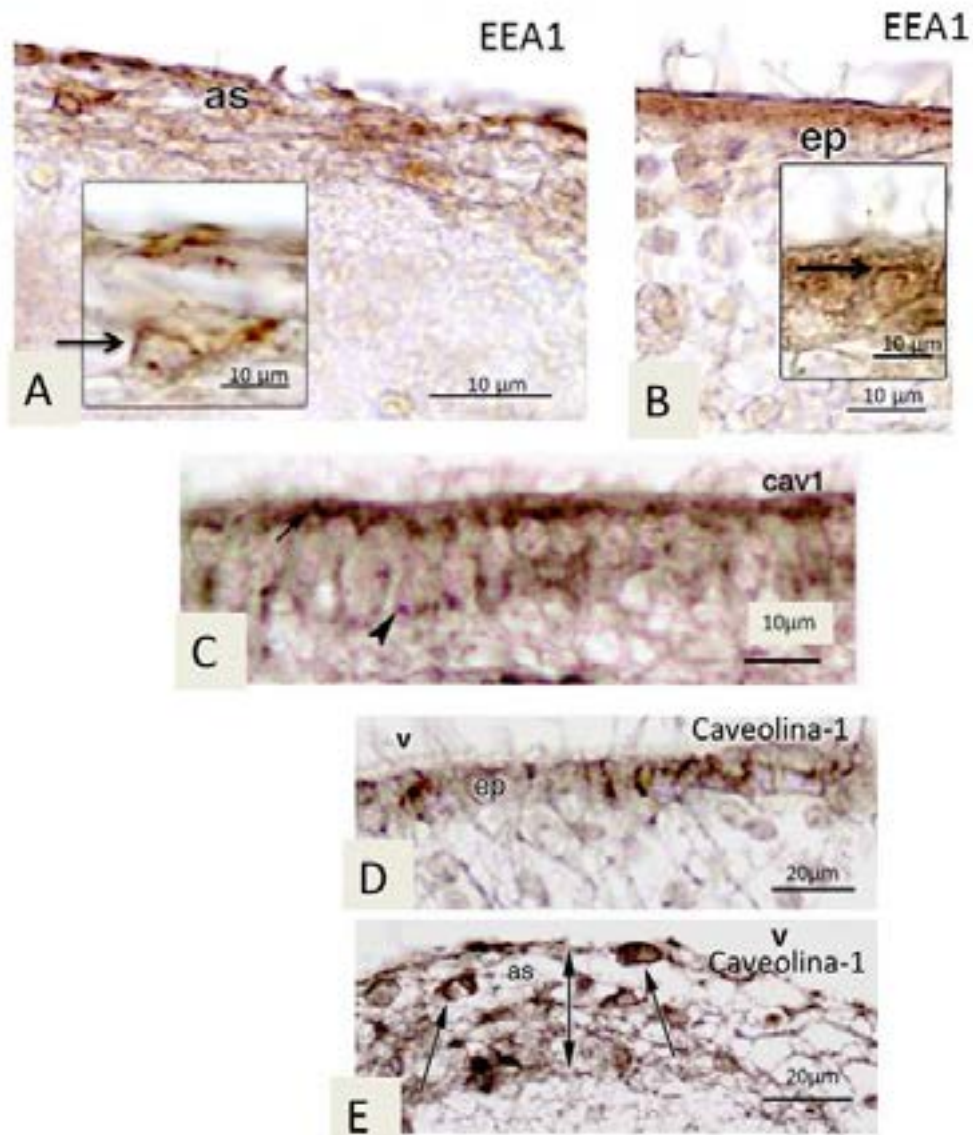


Lámina 23. A y B. Ventriculo lateral de un feto femenino hidrocefálico de 40SG. Inmunohistoquímica contra EEA1 (endosomas tempranos). A. Las células astrocitarias reactivas (as) en las zonas sin epéndimo presentan inmunoreactividad en sus cuerpos celulares (flecha en inserto en A) y prolongaciones basales. B. En las células ependimarias (ep) adyacentes que permanecen, los endosomas tempranos marcados se localizan en su citoplasma apical (flecha en inserto en B). C. Superficie ventricular de un feto control femenino de 30SG con inmunomarcaje para caveolina-1. La caveolina-1 se localiza preferentemente en la superficie ventricular del epéndimo (flecha) y en sus prolongaciones basales (cabeza de flecha). D y E. Superficie ventricular de feto femenino hidrocefálico de 40SG marcada con anti-caveolina 1, mostrando una zona con reacción astrocitaria (E) adyacente a una con epéndimo (D). Los astrocitos que recubren las zonas sin epéndimo forman una capa astrocitaria (as) (flecha de doble punta) y muestran inmunorreacción es su cuerpo celular (flechas) y prolongaciones basales. V, luz ventricular.

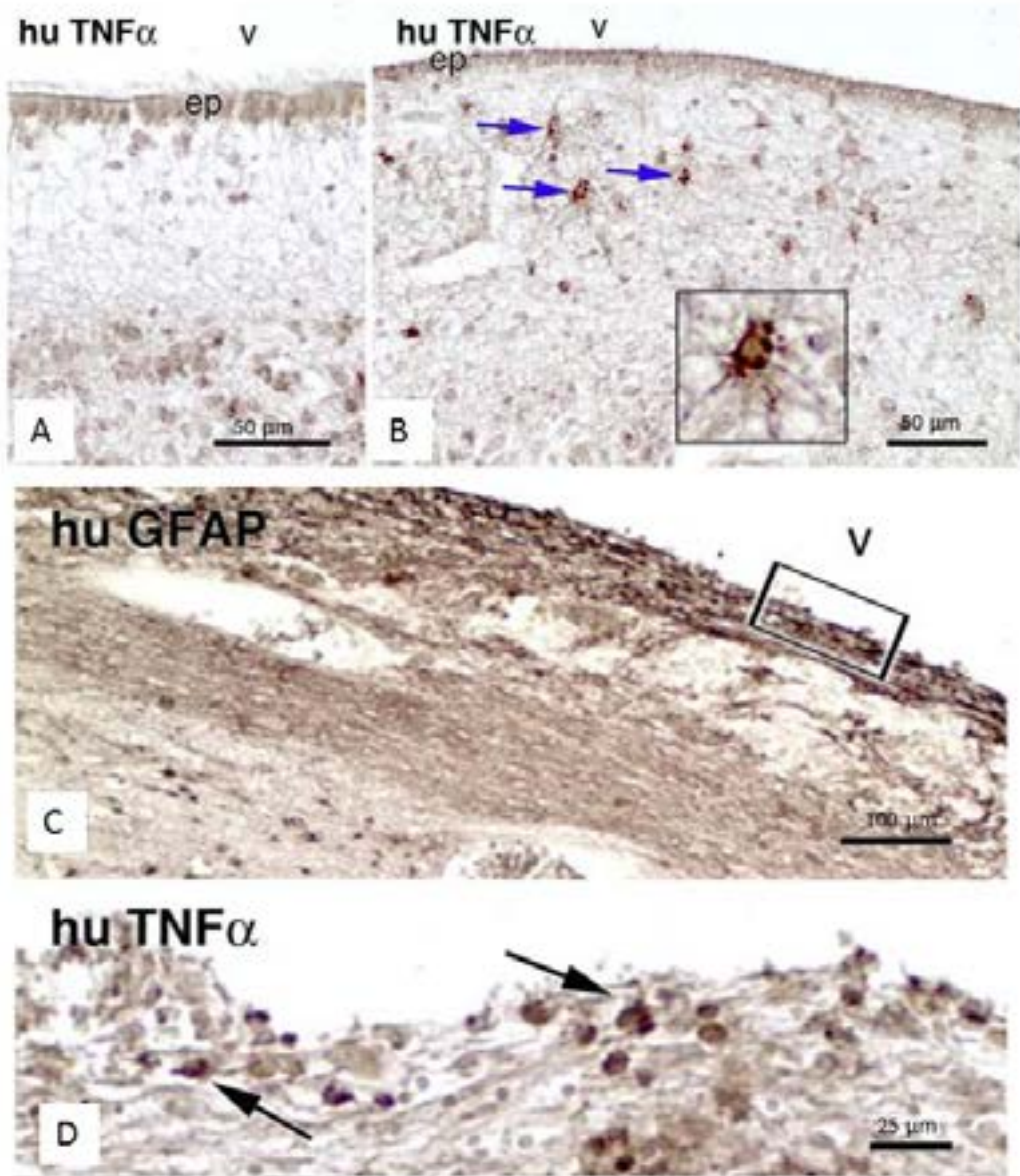


Lámina 24. Inmunohistoquímica contra TNF ($TNF\alpha$) (A, B y D) y GFAP (C) en paredes ventriculares. Control masculino (hu) de 25SG (A) y caso femenino (hu) hidrocefálico de 33SG (B, C y D). La zona del recuadro en C con marcaje para GFAP se muestra en D con anti-TNF. En el caso hidrocefálico, los astrocitos reactivos aparecen inmunomarcados en el parénquima nervioso (flechas azules en B) y formando la capa celular que recubre la superficie ventricular (flechas en D). V, ventrículo.

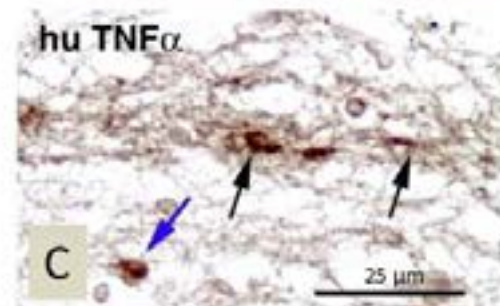
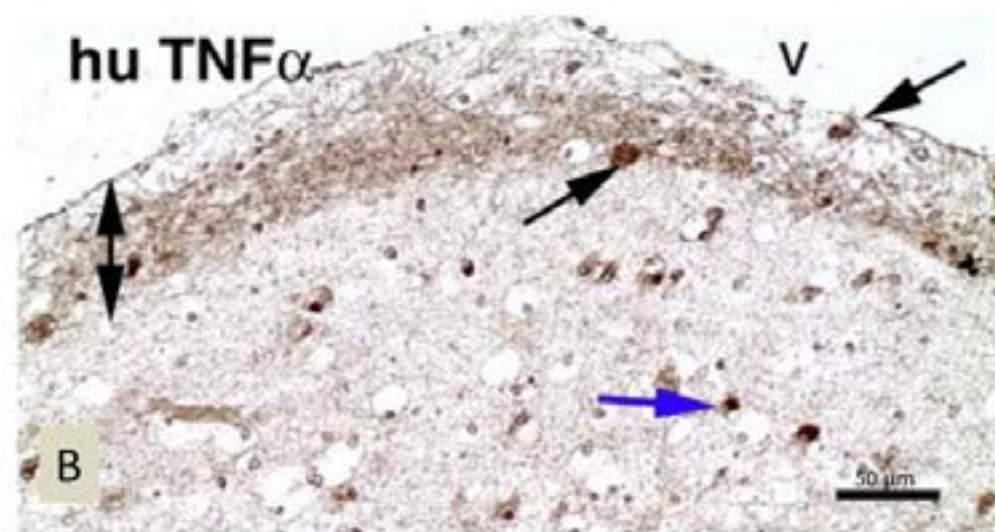
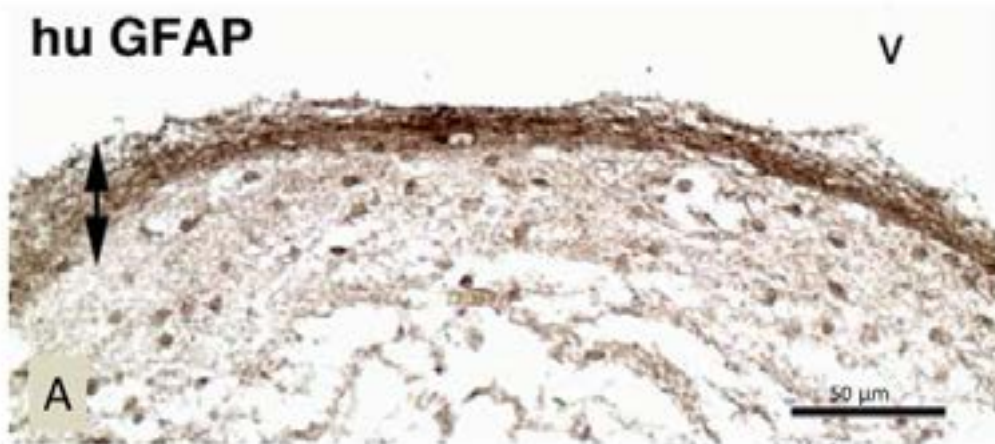


Lámina 25 . Superficie ventricular de feto femenino hidrocefálico (hu) de 40SG. A. Inmunomarcage para GFAP. B y C. Inmunomarcage para contra TNF (TNF α). Las células se marcaron con el anticuerpo TNF en la zona de la reacción de astrocitos en la superficie ventricular (flechas negras), y en regiones más alejadas de la superficie ventricular (flechas azules). Las flechas con doble punta en A y C muestran el grosor de la reacción astrocitaria periventricular.

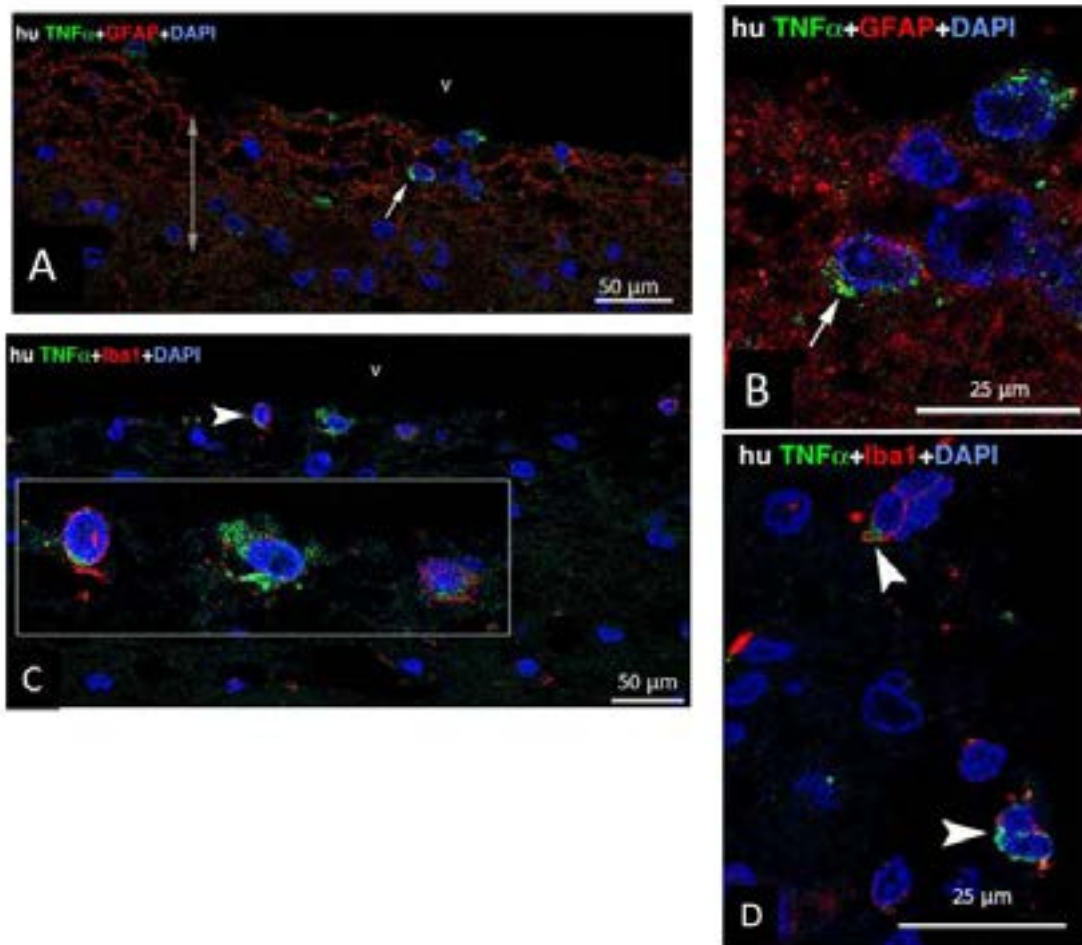


Lámina 26. Superficie ventricular en feto femenino hidrocefálico de 40SG. Inmunofluorescencia doble para TNF ($TNF\alpha$) (verde) y GFAP (rojo). Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (azul). A. Astrocitos para TNF (flecha) en la reacción glial (comprendida en la flecha con doble punta). B. Colocalización de GFAP y TNF (flecha). C y D. Doble inmunofluorescencia para para TNF (verde) e Iba-1 (marcador de microglia, rojo). Algunas de las células de la microglía expresan TNF (cabezas de flecha). El inserto en C es un detalle de las células marcadas en C. V, ventrículo.

5.5 Expresión de moléculas de adhesión

En los controles, se ha encontrado que la proteína de unión N-cadherina está presente en la membrana plasmática de las células endimarias multiciliadas formando un cinturón continuo alrededor del polo apical en los controles y en las zonas de epéndimo conservado en casos de hidrocefalia (lámina 27 A y B). También, en menor medida se pueden encontrar en sus dominios laterales (lámina 27 A).

En los fetos con diferentes formas hidrocefalia, incluyendo la de origen poshemorrágico, las células de la ZV, ya sean células de la glía radial o epéndimo maduro, presentaron alteraciones en la ZV que fueron manifiestas en cuanto a la expresión de N-cadherina. En los fetos hidrocefálicos jóvenes (21SG y 22SG), la interrupción se produjo en el palio, mientras que, en fetos de 40SG, la interrupción se extendió a otras regiones de los ventrículos laterales (lámina 27 C, D y F). Las células endimarias cerca de una zona con pérdida de epéndimo (y que probablemente corresponden a células candidatas a perderse) acumulan N-cadherina y caveolina1 formando grandes masas en el citoplasma (lámina 27 F, 16 B, 28 A y C). En las células endimarias de los fetos controles y de los fetos hidrocefálicos en las zonas que no se han perdido, la N-cadherina se localiza en el dominio lateral de la membrana plasmática (lámina 28 B) y la caveolina-1 se localiza cerca de la región apical y basal (lámina 16 B). En el único caso de hidrocefalia poshemorrágica estudiado se observó una expresión anormal de las cadherinas, incluyendo N-cadherina en el epéndimo según esté más o menos cerca de las zonas de desprendimiento (lámina 28 B y D y 29).

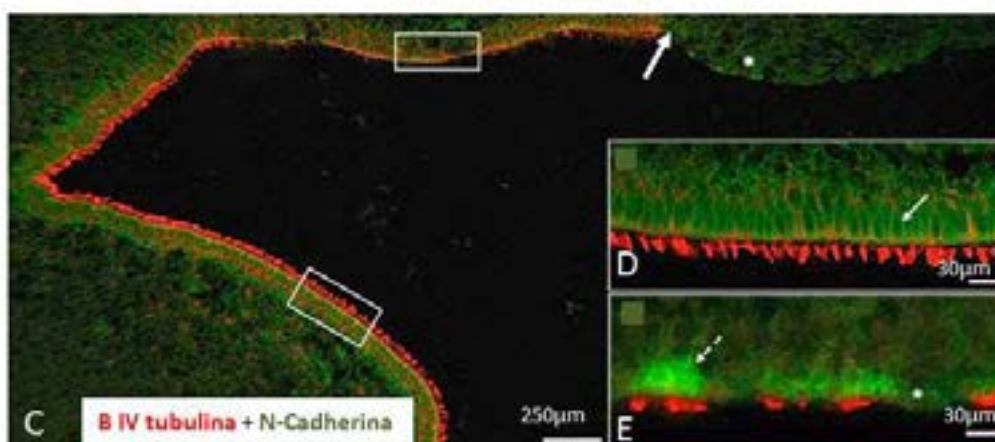
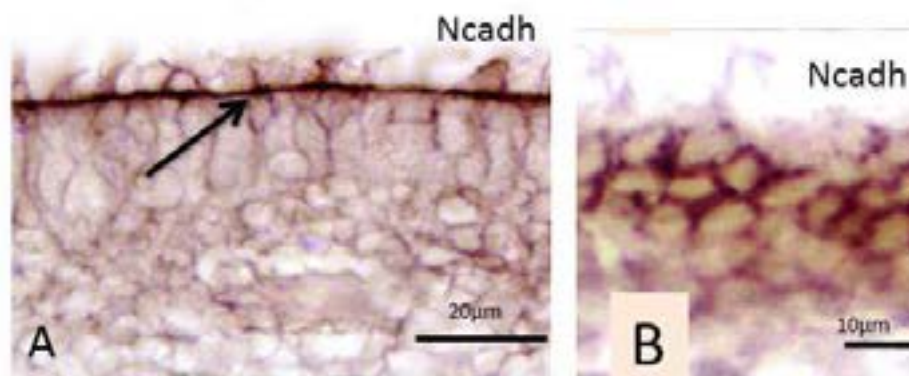


Lámina 27. A y B. Superficie ventricular de un feto femenino control de 30SG. Inmunomarcaje para N-cadherina. A. La N-cadherina aparece preferentemente en el dominio apical de las células endimarias (flecha), aunque también en sus dominios laterales. C, D y E. Feto de hembra hidrocefálica de 40SG. Doble inmunofluorescencia para tubulina β IV (rojo) y N-cadherina (verde). En C se muestra una pared ventricular mostrando una región sí epéndimo (asterisco) adyacente a otra con epéndimo conservado. El límite entre ambas lo marca la flecha). D y F. Detalles de las zonas enmarcadas en C con epéndimo más alejada de la zona sin epéndimo (D) y más cercana a la zona desnuda de epéndimo (E). La N cadherina aparece con una distribución aparentemente normal en las zonas alejadas de las carentes de epéndimo (flecha blanca continua en D). La N-cadherina aparece anormalmente distribuida por el citoplasma apical de las células endimarias cercanas a la superficie afectada sin epéndimo (flecha blanca discontinua en E).

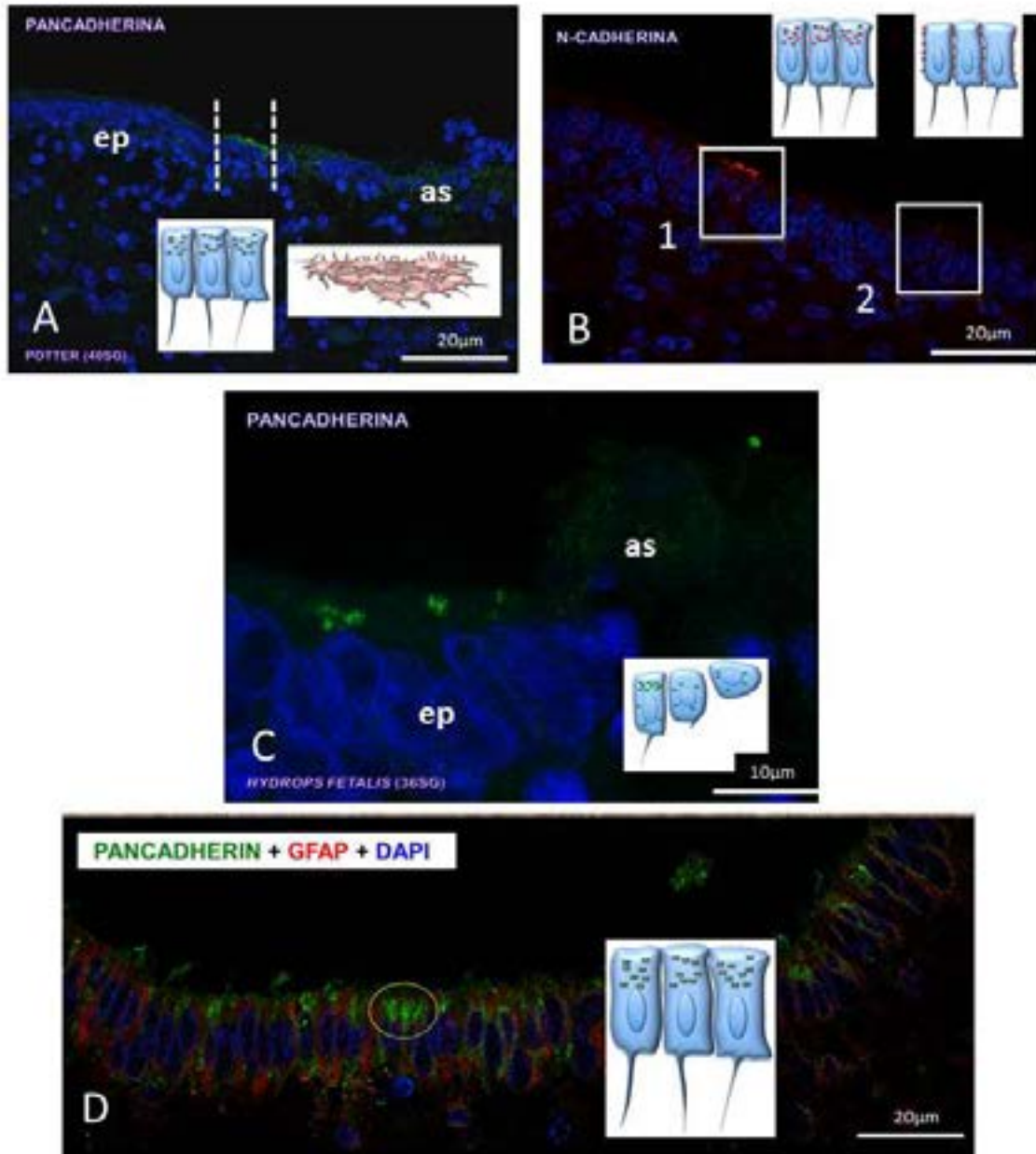


Lámina 28. A y C. Superficie ventricular de dos casos femeninos hidrocefálicos de 405G y 365G. B y D. Superficie ventricular de un feto con hidrocefalia posthemorrágica por prematuridad de 295G. Inmunofluorescencia para la detección de cadherinas (verde), GFAP (rojo) y N-cadherina (rojo). Tinción nuclear con DAPI (azul). A. Feto con síndrome de Potter e hidrocefalia. Se observa la transición (marcada por las líneas verticales) entre el epéndimo (ep) que permanece y la zona sin epéndimo y con reacción astrocitaria (as). La expresión de cadherina aparece alterada en la zona de transición, y localizada en el citoplasma apical del epéndimo (mostrada en esquema insertado a la izquierda). C. Zona equivalente de transición en un caso con *hydrops fetalis* de 365G. Los esquema insertados representan la distribución anómala de las cadherinas. B. Existe una expresión citoplasmática anormal de la N-cadherina en la zona adyacente a la carencia de epéndimo. D. Se señala (círculo) la región apical con una distribución citoplasmática de las cadherinas (esquemática en el inserto).

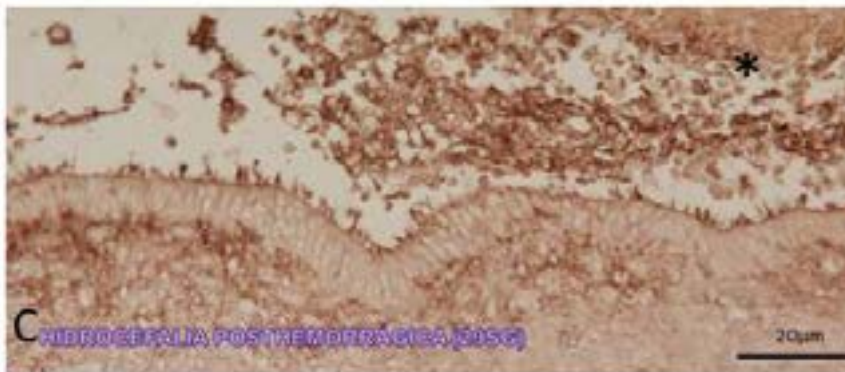
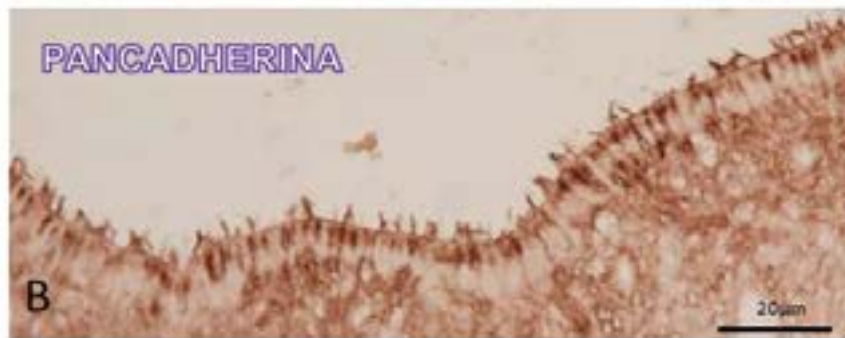
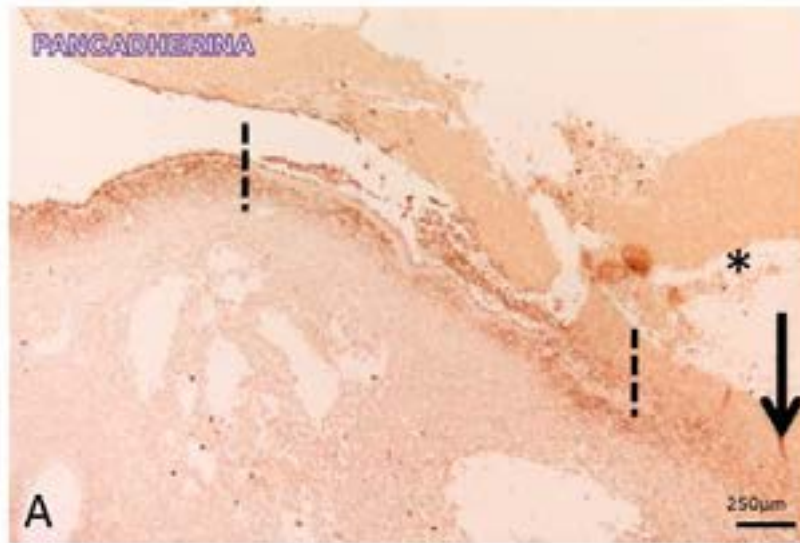


Lámina 29. Superficie ventricular de feto femenino de 295G con hidrocefalia posthemorrágica por prematuridad. Inmunohistoquímica contra cadherinas. A. Las líneas verticales determinan distintos patrones de expresión de la molécula de adhesión en el epéndimo que permanece (detalle en C). B. Ependimo con distribución anormal de cadherinas ubicadas en el citoplasma apical. C. Epéndimo próximo a zona de desprendimiento (flecha en A) sin expresión de cadherinas. Asteriscos, hemorragia intraventricular.

5.6 Alteraciones de la neurogénesis en la hidrocefalia: heterotopías

Los fetos humanos hidrocefálicos de 36-40SG presentan zonas en los ventrículos laterales con conservación del epitelio endimario donde la ZSV está bien organizada. Estas regiones están formadas por:

- Una sola capa de epéndimo multiciliado con células que expresan GFAP (lámina 14 D y 18 B).
- Una delgada capa de pequeñas células esféricas que contienen tubulina β III y que corresponden a neuroblastos (lámina 18 A, 30 A).
- Una gruesa capa glial de fibras GFAP positivas (lámina 18 D).
- Una capa neural reactiva tubulina β III positiva (lámina 18 C y 30 B).

En algunas zonas donde el epitelio endimario se ha perdido, se han encontrado varios tipos de alteraciones en la distribución de neuroblastos que puede tener relación con su migración anómala.

-Una de las formas es la descrita, una anormal abundancia de células tubulina β III positivas que corresponden a neuroblastos que se distribuyen dentro de la capa astrogial (lámina 18 C y D).

-En las zonas sin epéndimo, ha sido frecuente encontrar pequeños grupos de neuroblastos sobre la superficie ventricular carente de epéndimo y tapizada por astrocitos reactivos (lámina 30 B y C, y 31 A y B).

-En ocasiones, los neuroblastos se localizan también acumulados en los capilares del SNC (lámina 31 C, 32 A y B).

-Se observan también acúmulos de células compatibles con neuroblastos en la subplaca en los casos en que se ha perdido el epéndimo y se ha formado una barrera astrogial en la ZV (lámina 32 C-G).

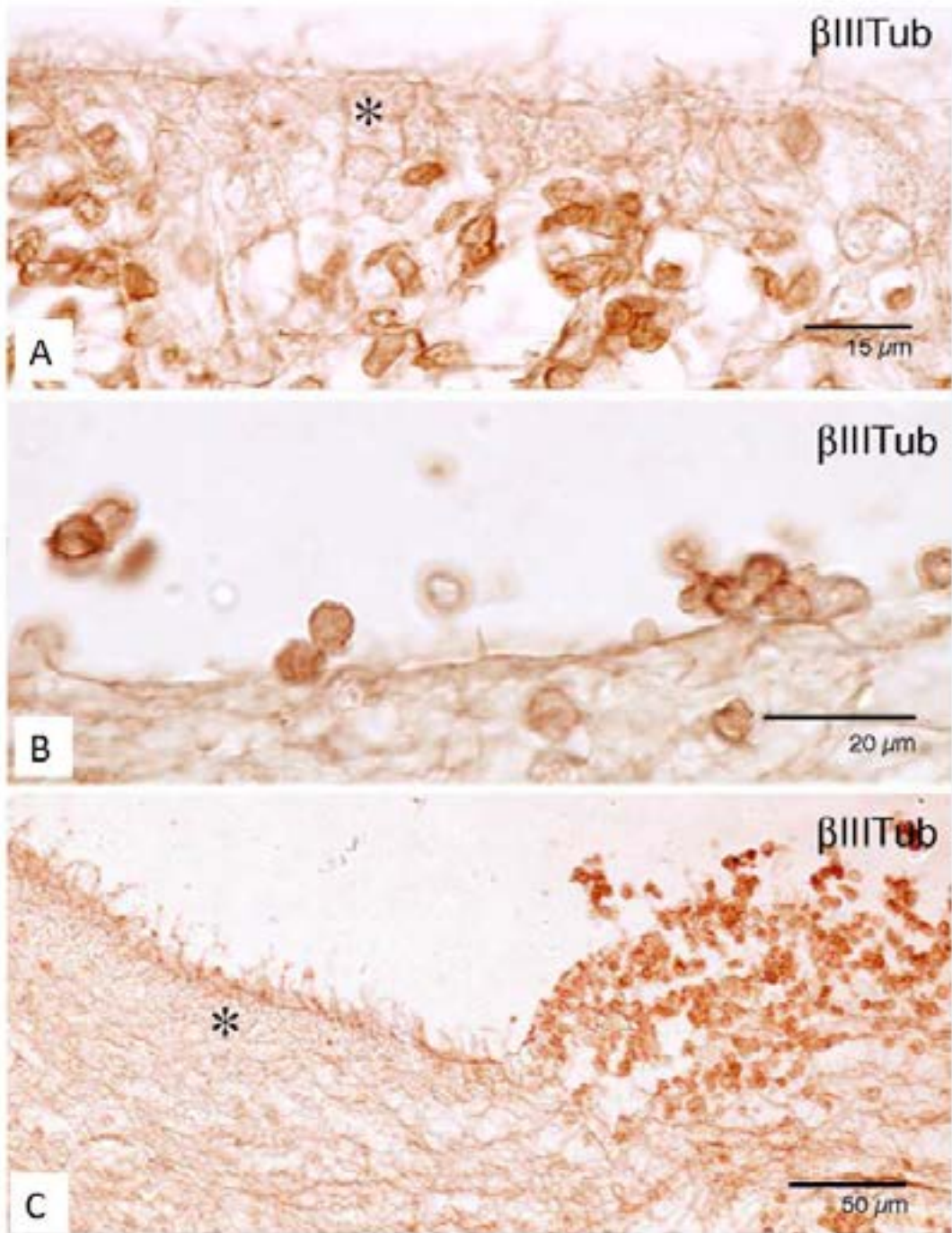


Lámina 30. Superficie ventricular con inmunohistoquímica contra tubulina β III en un feto femenino hidrocefálica, de 40SG. A. Zona con epéndimo conservado (asterisco). B. Zona sin epéndimo con neuroblastos en la superficie ventricular tubulina β III+. C. Zona denudada con grupo de neuroblastos que caen al ventrículo.

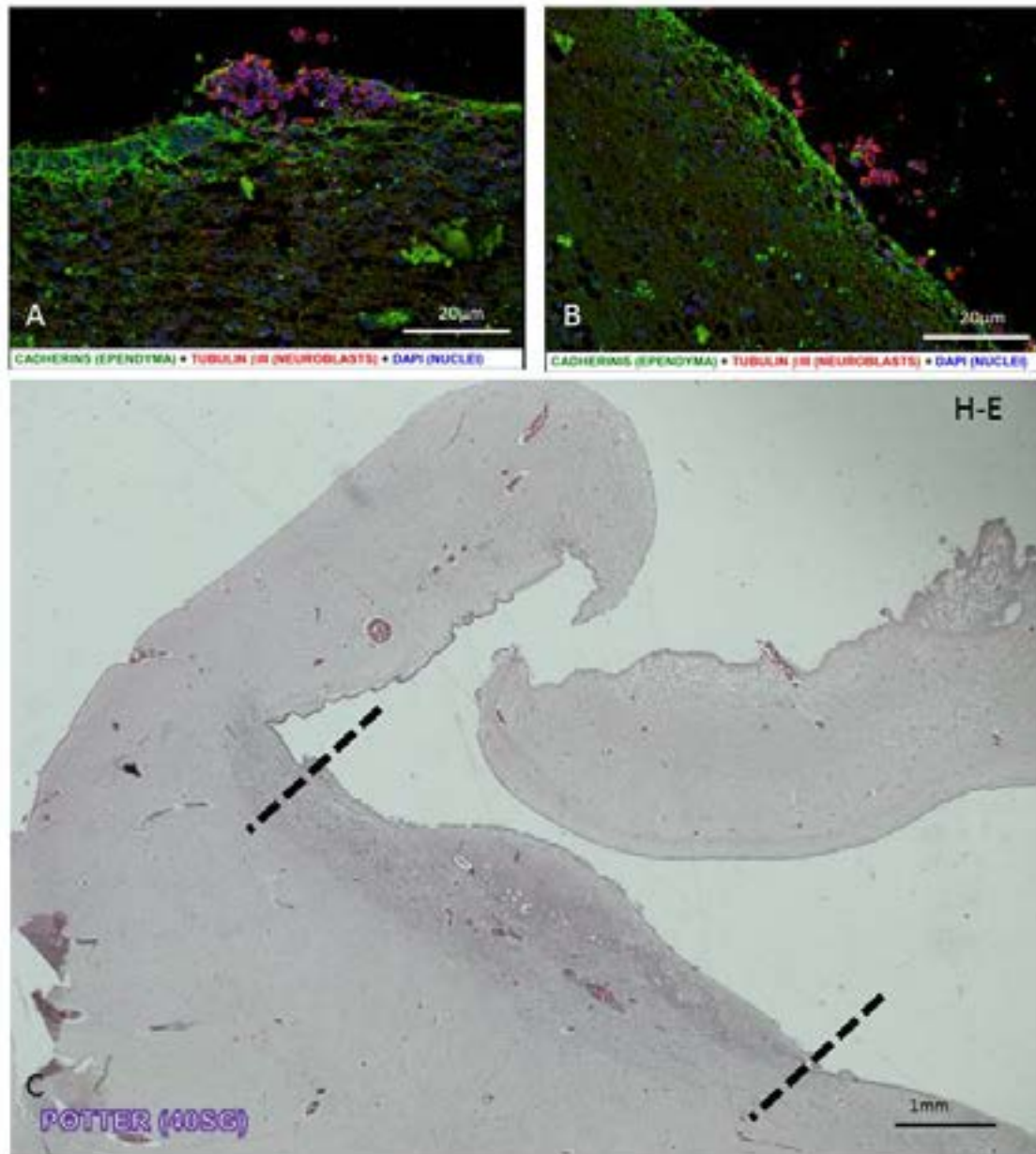


Lámina 31. A y B. Superficie ventricular feto femenino hidrocefálico de 40SG. Inmunofluorescencia con doble marcaje para cadherinas (verde) y tubulina β III (rojo), junto a tinción nuclear con DAPI (azul). A. Transición entre una zona que conserva el epéndimo y una adyacente denudada de epéndimo. B. Zona sin epéndimo. Se muestra la desorganización de la ZSV apareciendo neuroblastos en regiones anómalas, como dentro de la luz ventricular. C. Superficie ventricular en un caso femenino hidrocefálico de 40SG. Hematoxilina-eosina (H-E). La zona entre líneas muestra una zona sin epéndimo con neuroblastos formando heterotopías.

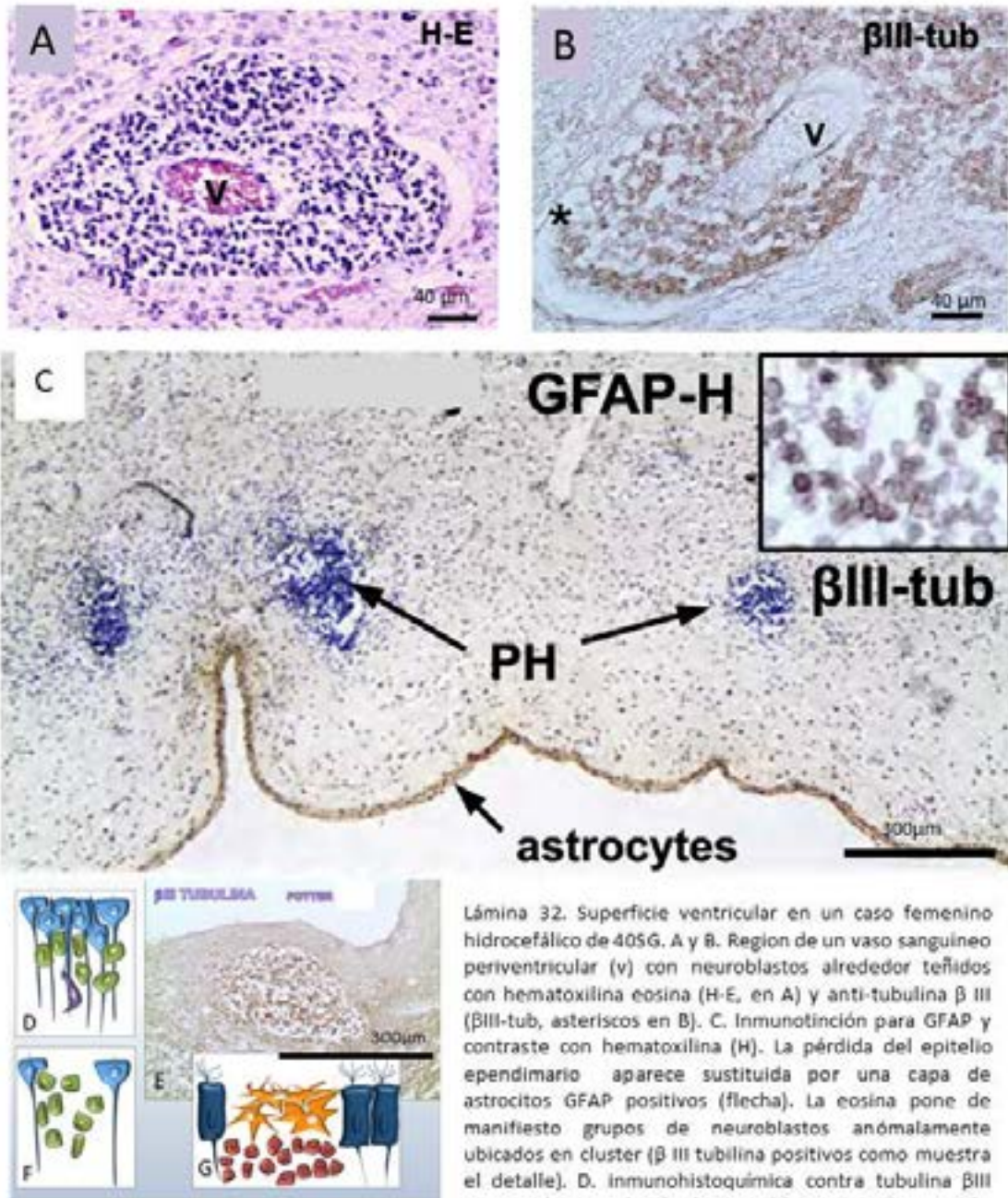


Lámina 32. Superficie ventricular en un caso femenino hidrocefálico de 40SG. A y B. Region de un vaso sanguíneo periventricular (v) con neuroblastos alrededor teñidos con hematoxilina eosina (H-E, en A) y anti-tubulina β III (β III-tub, asteriscos en B). C. Inmunotinción para GFAP y contraste con hematoxilina (H). La pérdida del epitelio ependimario aparece sustituida por una capa de astrocitos GFAP positivos (flecha). La eosina pone de manifiesto grupos de neuroblastos anómalamente ubicados en cluster (β III tubulina positivos como muestra el detalle). D. Inmunohistoquímica contra tubulina β III mostrando un acúmulo de neuroblastos bajo la reacción astrocitaria periventricular. D, y E. Esquemas que muestra las distribuciones de neuroblastos (verde) bajo la glía radial (azul) en un caso normal (D) y patológico (F). La célula violeta en D es un precursor neuronal en migración. G. Esquema que representa lo que puede ocurrir después de la diferenciación de la ZV en la hidrocefalia con ausencia de epéndimo (azul) con reacción astrocitaria periventricular (naranja) y acúmulo de neuroblastos (marrón).

5.7 Análisis del LCR de casos con diferentes tipos de hidrocefalia: niveles de TNF α

Mediante ELISA se han cuantificado los niveles de TNF α en muestras de LCR de casos con diferentes formas de hidrocefalia. En los controles, los niveles detectados en el LCR oscilaron entre 1 a 2,5 pg/ml (lámina 33 A). En los casos con hidrocefalia no comunicante y estenosis acueducto cerebral, los niveles de TNF α variaron en los diferentes momentos de la recogida de muestras y en los tres casos estudiados alcanzaron niveles de hasta 12 a 30 pg/ml. Los niveles en el único caso estudiado con síndrome de Dandy-Walker fueron similares a los controles (lámina 33 B). En los pacientes con hidrocefalia poshemorrágica, los niveles de TNF α alcanzaron 7-17 pg/ml (lámina 33 A). Los niveles de TNF α en los casos que presentaban hidrocefalia obstructiva, sin complicaciones antes de la aplicación de su primera derivación, no fueron significativamente diferentes en comparación con los niveles presentes en los controles (lámina 33 A). Sin embargo, la mayoría de las muestras de los casos que requirieron intervenciones, debido a las obstrucciones/cambios en el drenaje o válvulas, presentaron niveles más altos de TNF α por ml de LCR en comparación con los controles (lámina 33 C y D). Las diferencias encontradas no fueron significativas en los niveles de TNF α entre los controles y los casos de hidrocefalia.

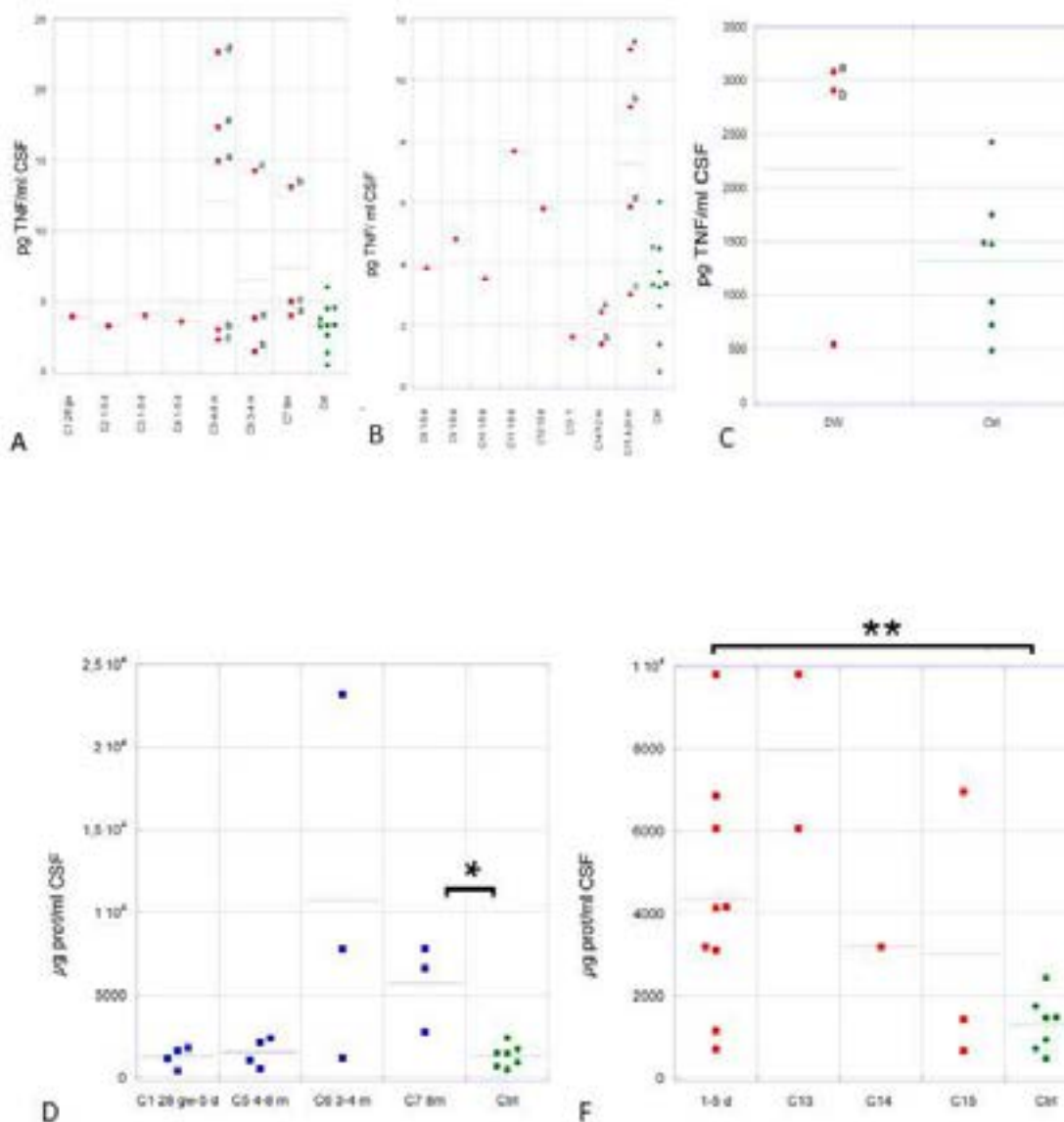
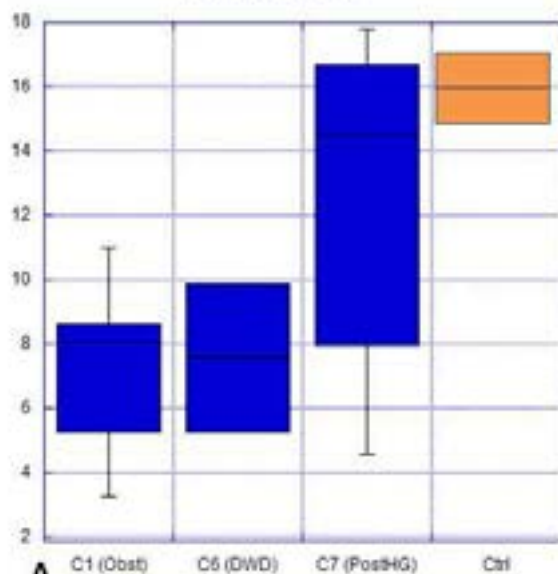


Lámina 33. Niveles de TNF α y proteína total en el LCR en las diferentes formas de hidrocefalia. Casos con hidrocefalia obstructiva (A y D), poshemorrágica (B y F) y Dandy-Walker (DW; C). Los niveles de los controles (Ctrl) están representados con puntos verdes. A, B y C. Niveles de TNF α respecto a ml de LCR. * $p < 0,02$, ** $p < 0,025$. Las letras a-e en las figuras A, B y C muestran distintas muestras para un mismo caso debidas a complicaciones de las derivaciones. Los casos aparecen numerados con la letra C seguida del número. Las edades aparecen en semanas de gestación (gw), días (d) o meses (m). Los números de los casos se corresponde con los detallados en la tabla indicada en materiales y métodos.

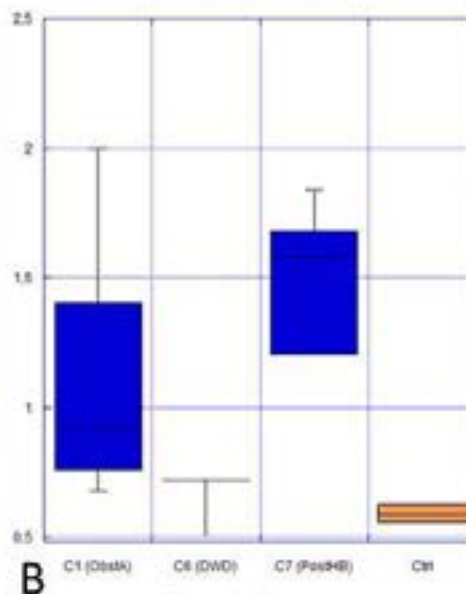
5.8 Análisis metabólico del LCR de casos con diferentes tipos de hidrocefalia

En el estudio espectroscópico mediante HR-MAS no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de lactato, creatina y mioinositol respecto a los controles, posiblemente debido al escaso número de individuos control del que se dispone. Sin embargo, se puede detectar que existe una tendencia hacia niveles más altos de lactato y creatina en casos de hidrocefalia respecto a los controles, siendo siempre más altos en la hidrocefalia poshemorrágica (lámina 34). También se ha observado un aumento de mioinositol más significativo en los casos de hidrocefalia obstructiva (lámina 34 C).

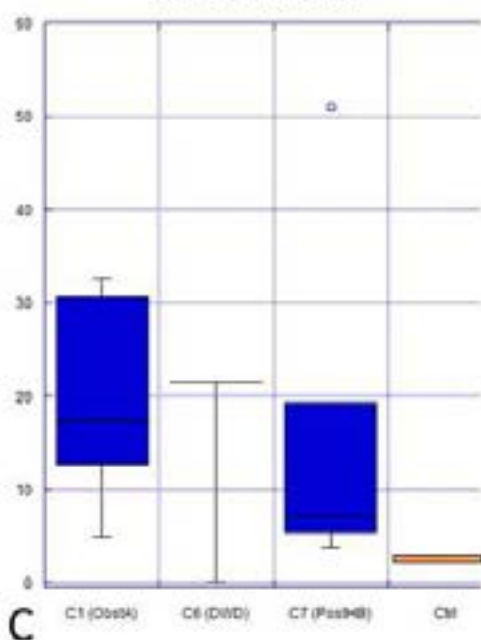
α Glucosa



Creatina



Mioinositol



Lactato

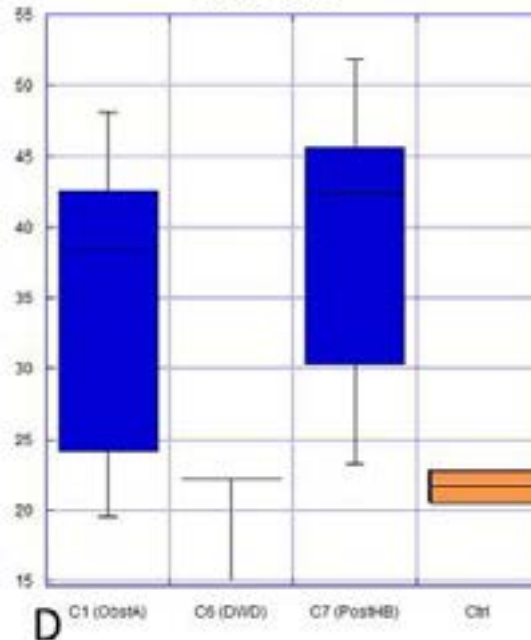


Lámina 34. Niveles de metabolitos detectados en el LCR (ppm). Representaciones en cajas. A. Los niveles de α glucosa aparecen disminuidos aunque no son estadísticamente significativos. Están más disminuidos en los casos de hidrocefalia obstructiva (C1 Obstr) y Dandy-Walker (C6 DWD), pero no en el poshemorrágico (C7 postHG). Los niveles de los controles (Ctrl) aparecen en naranja. En B, C y D se muestran los valores de creatinina, mioinositol y lactato. Los números de los casos se corresponde con los detallados en la tabla indicada en materiales y métodos.

5.9 Correlación radiopatológica en un caso humano

Se trata de un neonato varón, nacido pretérmino moderado (36+4SG), con bajo peso al nacer (2600 g). Fue concebido mediante fecundación in vitro (FIV) y el embarazo cursó de alto riesgo controlado por polihidramnios grave. Se le realizó una amniocentesis a las 16SG, presentando el feto un cariotipo normal. No hay antecedentes familiares de interés. En el seguimiento obstétrico se identificó una simetría del sistema ventricular con una dilatación del ventrículo izquierdo a las 20SG, por lo que se le solicita una RM fetal que se realiza a las 22SG (lámina 35). El estudio mostró una dilatación del sistema ventricular a nivel del ventrículo lateral izquierdo (con un atrio de 10,4 mm) y una dilatación piélica leve bilateral renal (R/L, 8/4 mm de diámetro anteroposterior). Nacido mediante cesárea al fracasar la inducción del parto. El niño dio resultados en el test de Apgar de 0 al nacer y de 2 a los 5 minutos. El test de Apgar mide el bienestar del bebe tras el parto, mediante un examen clínico que se realiza al recién nacido después del parto, donde se valoran 5 parámetros para obtener una primera valoración simple (macroscópica), y clínica sobre el estado general del neonato. Su puntaje total va de 1 a 10. Cuanto más alto sea el puntaje, mejor será la evolución del neonato después de nacer. Cualquier puntaje inferior a 7 es una señal de que el bebé necesita atención médica para adaptarse fuera del vientre materno.

Dado que el caso estudiado presentó unos valores muy bajos en la escala Apgar, el niño fue intubado al nacer. Analizado el fenotipo presentaba una frente prominente, una implantación baja de pabellones auriculares, fisuras palpebrales pequeñas y hundidas, caderas en “libro abierto” con limitación a la extensión de las extremidades, criptorquidia bilateral, hendidura palmar única, y una hipoplasia pulmonar derecha *versus* hernia diafragmática en la radiografía de tórax.

La ecografía transcraneal realizada al nacer mostró una pequeña asimetría de los ventrículos laterales, presentando el ventrículo lateral izquierdo ventriculomegalia leve, de 5,5 mm en la hendidura caudotalámica (siendo normal a 5 mm). El estudio doppler en la arteria pericallosa mostró niveles normales, con un índice de resistencia de 0,8 (dentro del límite superior de la normalidad) (lámina 36 A y B).

Se le realizó un ecocardiograma transtorácico normal y una ecografía de tórax, abdomen y caderas, con resultados normales. Se completó el estudio con un TAC de tórax que descartaba la hernia diafragmática y se realizó una broncoscopia que no pudo pasar a través del bronquio principal derecho.

El niño murió por hipoxemia refractaria e insuficiencia respiratoria dos semanas después del nacimiento.

Tras el estudio en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Materno-Infantil, el tejido cerebral excedente de diagnóstico se trasladó a la Universidad de Málaga para estudio histopatológico del encéfalo. La superficie ventricular presenta zonas que contienen el epitelio ependimario conservado y áreas sin epéndimo (lámina 36 C). También se observaron

localizaciones anómalas de los neuroblastos, que aparecen en la superficie ventricular (lámina 36 F) y en grupos en la ZSV (lámina 36 E). También se observan las alteraciones descritas en la expresión de N-cadherina en las zonas de epéndimo adyacente a las zonas sin epéndimo (lámina 37).

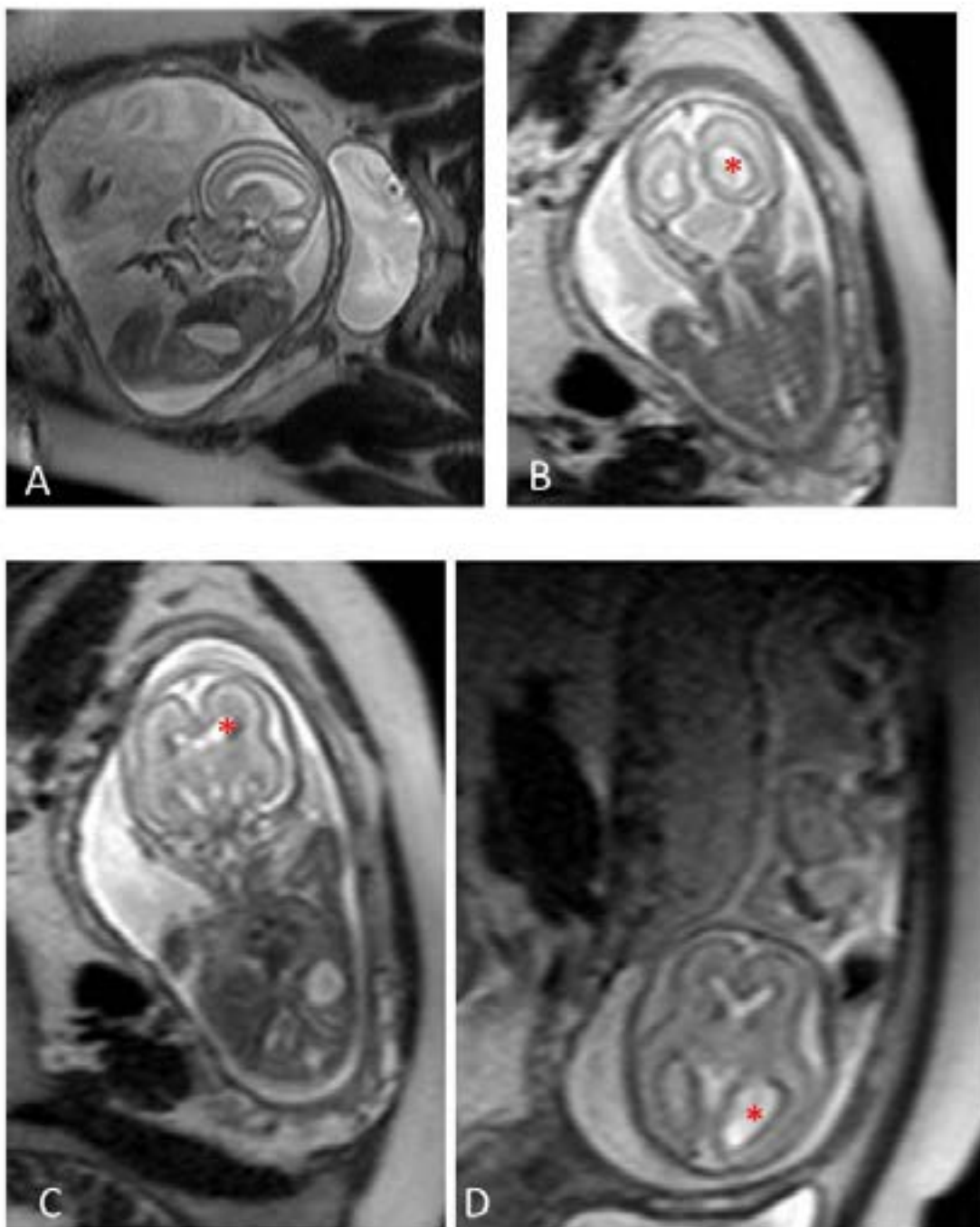


Lámina 35. A-D. Imágenes de RM de un feto masculino de 22SG centrado en el cráneo. El estudio de la morfología del sistema ventricular muestra que existe una asimetría con crecimiento del ventrículo lateral izquierdo (asteriscos).

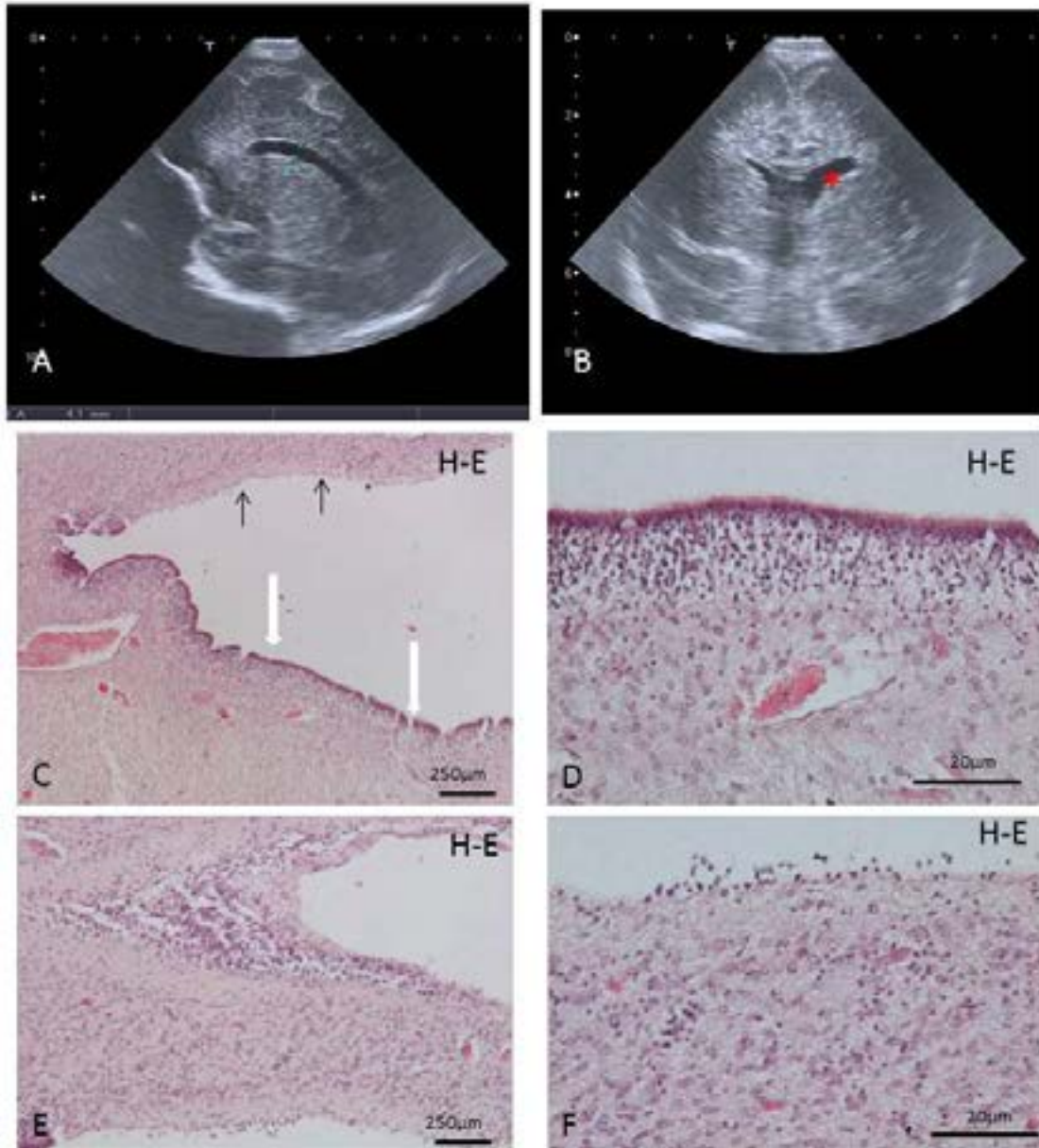


Lámina 36. A y B. Ecografía transfontanelar de feto masculino a las 48 horas del nacimiento que muestra un tamaño de la hendidura caudotalámica de 5,5 mm y una asimetría de los ventrículos con aumento del izquierdo (asterisco). A. Vista sagital. B. Vista frontal. C, D, E y F: Ventriculo lateral. Hematoxilina-eosina (H-E). Aparecen zonas con epéndimo (flechas blancas en C, detalle en B) y sin epéndimo (flechas negras en C, detalle en F) Los neuroblastos se observan como grupos de células basófilas que corresponden a neuroblastos con localización anormal en las zonas sin epéndimo (E y F)

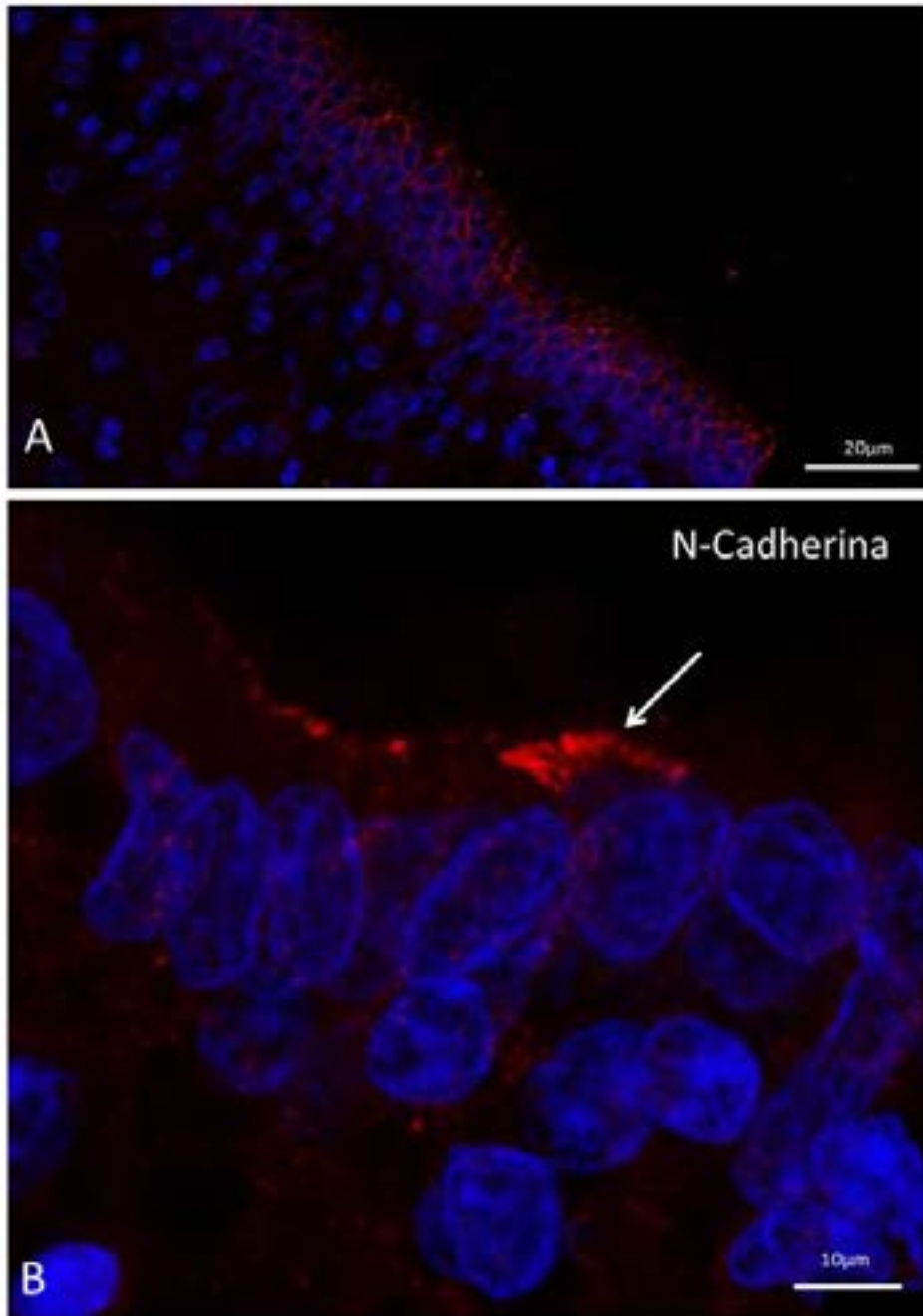


Lámina 37. Inmunofluorescencia para la detección de N-cadherina (rojo). Tinción nuclear con DAPI (azul). Superficie ventricular marcada con inmunofluorescencia con N cadherina. A. Zona con epéndimo normal. El corte parcialmente tangencial permite apreciar la formación de cinturones apicales. B. Zona de epéndimo adyacente mostrando una localización supranuclear anómala de N-cadherina (flecha).

5.10 Casos clínicos humanos: correlación entre imagen radiológica y resultados en estudio de LCR

5.10.1 Caso 1. Femenino con estenosis de acueducto de Silvio

Fecha de nacimiento: 29/6/2001.

Historial médico y diagnóstico:

-Embarazo controlado con *screening* prenatal negativo para cromosomopatía.

-Diagnóstico a las 28SG de hidrocefalia triventricular.

-Parto por cesárea por desproporción pélvico-cefálica a las 36SG. Peso al nacer 2950 g.

-30/6/2001. Se realiza ecografía transfontanelar que muestra dilatación de ambos ventrículos más significativo a nivel del asta posterior y más llamativo en el lado izquierdo y dilatación del III ventrículo (lámina 38 A).

-2/7/2001. Estudio de Tomografía Computerizada (TC) de cráneo que muestra dilatación de ventrículos laterales más significativo en asta temporal y occipital, con III ventrículo normal y IV ventrículo pequeño sin edema transependimario.

-6/9/2001. Ingreso por aumento de la presión intracraneal, con alta 8/10/2001:

- Cambio de válvula de derivación ventriculoperitoneal. 7/9/2001.
- Meningitis por *S. epidermidis*. 19/9/2001.
- TAC 20/9/2001. Dilatación VL y III ventrículo. Se localiza el catéter con extremo proximal en VL derecho. Se detectó edema transependimario.

-18/10/2001. Ingreso para recambio valvular.

-25/10/2001. TC de cráneo con dilatación severa de VL junto con presencia de surcos y cisuras indicadoras de que no existía edema cerebral (lámina 38 B y C).

-17/12/2001. Infección urinaria por *E. coli*.

-5/01/2002. TC de cráneo que pone de manifiesto la dilatación VL y III ventrículo.

-5/3/2002. Meningitis-ventriculitis por *Klebsiellaoxytoca*. Varicela.

-15/04/2002. Neuroendoscopia para realizar perforación en el suelo del tercer ventrículo (ventriculostomía premamilar).

-15/4/2002. TC de cráneo que muestra hematoma frontal izquierdo y hematoma subdural derecho con áreas de resangrado. Pérdida de los surcos cerebrales del hemisferio izquierdo indicativo de edema cerebral. Neumoencéfalo y neumoventrículo en relación con neuroendoscopia previa. Lesión vascular isquémica frontoparietal derecha (lámina 39 y 40 A).

-28/5/2002. Ingreso Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid).

- 4/6/2002. Se realiza una nueva intervención para tratamiento de la dilatación selectiva del asta temporal izquierda mediante un catéter ventricular que posteriormente se acopla a una válvula de otro catéter craneal.
- Registro de presión craneal basal normal con picos de hipertensión de hasta 17 mm de altura en la columna de agua (en condiciones normales deben ser 15 mm en la columna de agua en decúbito supino).

-23/7/2002. TC de cráneo mostró la línea media centrada y una discreta disminución del asta ventricular temporal izquierda. El asta temporal derecha aparece dilatada de forma persistente (posible ventrículo excluido). Las astas frontales aparecen sin alteraciones. III ventrículo aumentado de tamaño y localizado en la línea media.

-20/9/2002. Valoración neurológica con retraso mental severo. Ceguera bilateral. Epilepsia parcial que precisa de dos fármacos para su control parcial. Encefalopatía isquémica.

-15/11/2006. Valoración traumatología con tetraplejia espástica severa.

La cuantificación de los niveles de TNF α en el LCR muestra que sus valores por encima de los controles (lámina 40 B). Los niveles a los 4 meses, momento en el que se evidenció una disfunción de la válvula de derivación, mostraron un aumento significativo, disminuyendo posteriormente para volver a aumentar previamente al fenómeno hemorrágico (lámina 40 C).

El estudio de los niveles de metabolitos en el LCR mostró una elevación para el lactato a los 4 y 8 meses, al igual que ocurría con los niveles de TNF α (lámina 41 A). Los niveles de glucosa están por debajo de la detectada en los controles. En cambio, los niveles de creatina y mioinositol están aumentados respecto al control, sobre todo este último (lámina 41 B). Cuando observamos como varían los niveles de mioinositol con la edad observamos que aparece muy aumentado a los 5 meses (segunda terminación) (lámina 41 A).

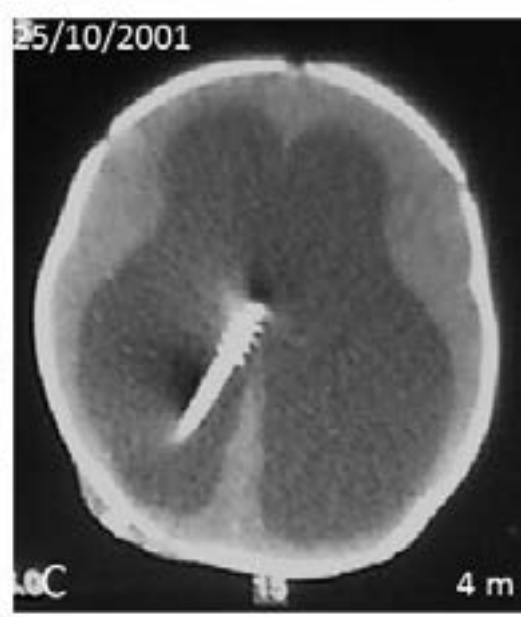


Lámina 38. Caso 1. Femenino con estenosis de acueducto de Silvio. Estudio en el recién nacido (A) y a los 4 meses de vida (B y C). A. Ecografía transfontanelar de recién nacido que muestra la dilatación del ventrículo lateral izquierdo. B y C. Corte axial de TC cráneo a nivel de VL a los cuatro meses de edad. En C se muestra el catéter proximal en VL derecho.

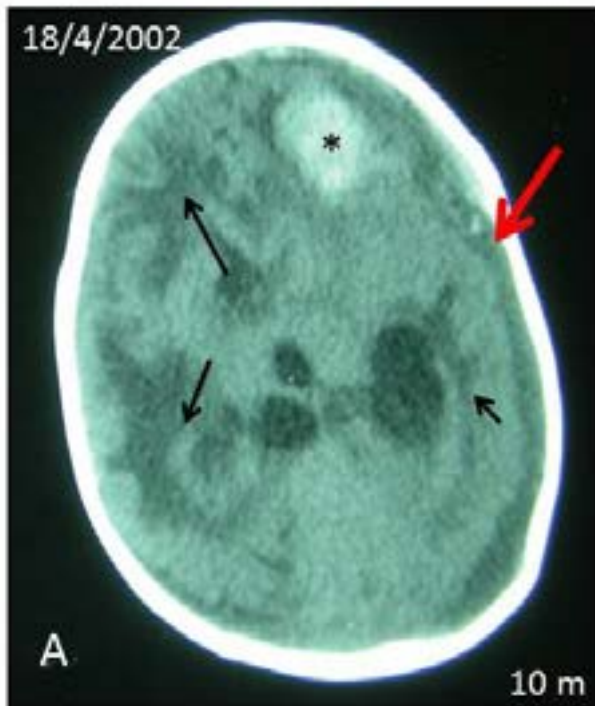
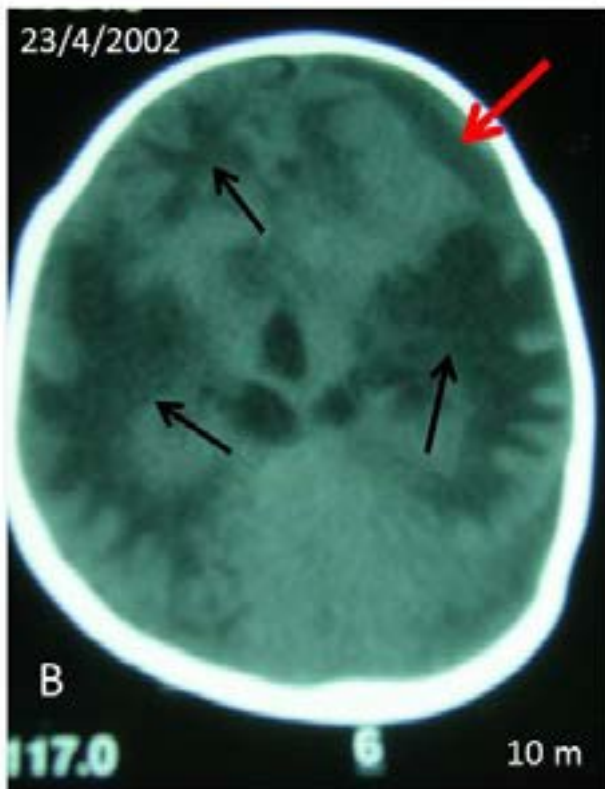


Lámina 39. Caso 1. Dos imágenes de corte axial de TC de cráneo que muestran la complicación hemorrágica sufrida a los 10 meses tras la realización de la neuroendoscopia. Foco frontal hiperdenso izquierdo (*). Hematoma subdural izquierdo en evolución (flechas rojas). Se aprecia el edema de sustancia blanca y la ausencia de surcos (flechas negras).



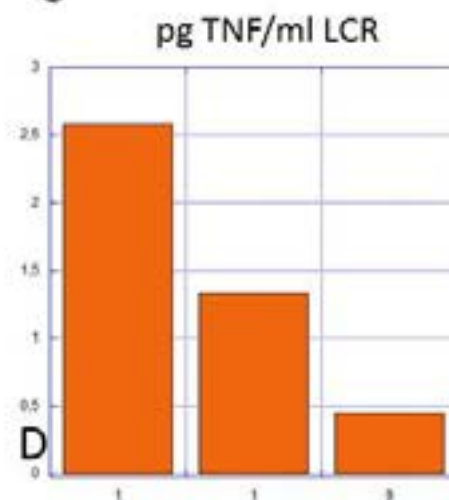
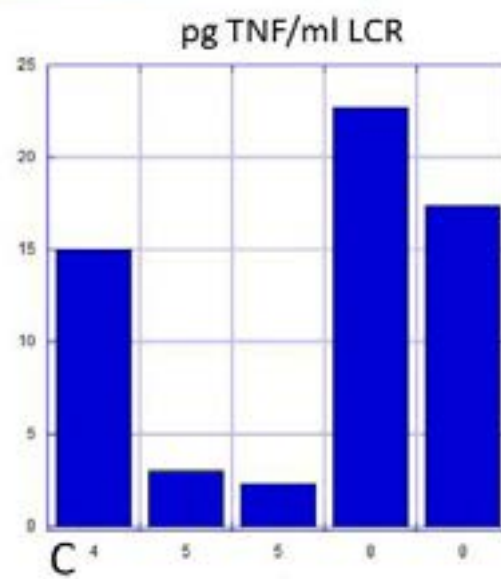
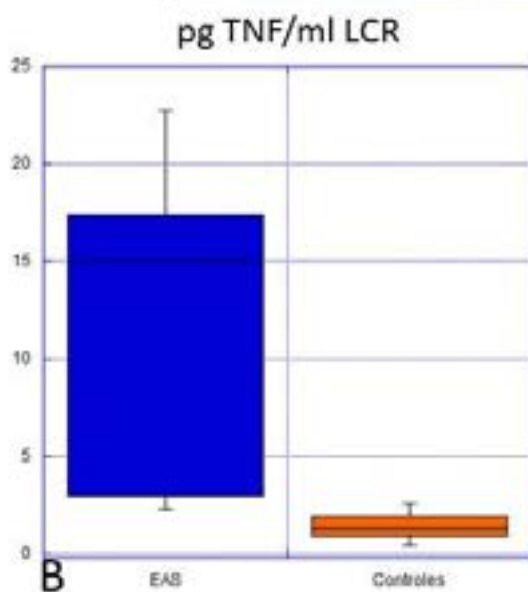


Lámina 40. Caso 1. A. Ecografía transfontanelar, a los 10 meses de edad, que muestra el hematoma en el asta frontal izquierdo. B. Niveles de TNF α en comparación con los controles. C. Niveles de TNF α en función de la edad (meses) y las complicaciones sufridas. D. Niveles de TNF α en el LCR de tres controles con diferentes edades (meses). EAS: Estenosis de acueducto de Silvio.

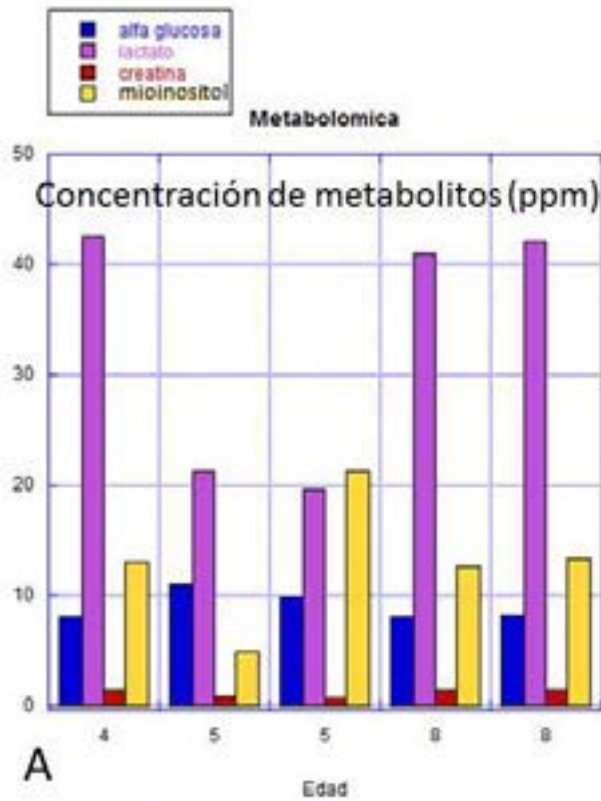
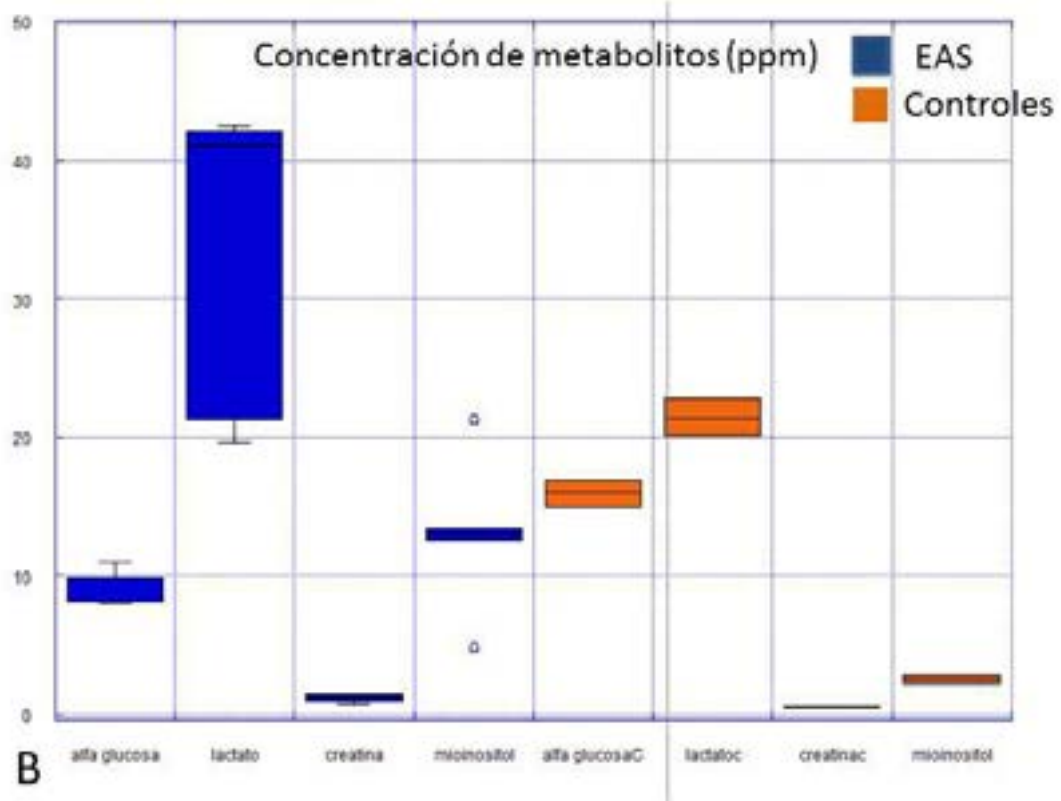


Lámina 41. Caso 1. A. Concentración de metabolitos en el LCR en función de la edad (meses). B. Diagrama de caja. Mostrando una comparación de la concentración de los distintos metabolitos detectados en el caso en diferentes momentos con respecto a los controles. La edad aparece reflejada en meses. EAS: Estenosis de acueducto de Silvio.



5.10.2 Caso 2. Varón con estenosis de acueducto de Silvio

Fecha de nacimiento: 22/10/01.

Historial médico y diagnóstico:

-Paciente inmigrante, de origen magrebí trasladado a Málaga desde el Hospital de Ceuta por macrocefalia. Embarazo no controlado.

-20/11/2001. Se le coloca una válvula de derivación ventrículo-peritoneal a los 24 días de vida.

-23/11/2001. Se realiza ecografía transfontanelar mostrando dilatación de sistema ventricular supratentorial (hidrocefalia triventricular) a expensas de los ventrículos laterales y el III ventrículo (lámina 42 A y B).

-3/1/2002. Disfunción valvular con fuga de LCR e infección de catéter. Colocación de drenaje externo.

-22/1/2002. TC de cráneo de control tras colocación de la válvula de derivación (lámina 42 C y D).

-9/1/2002. Valoración neurológica por crisis tónico-clónicas epilépticas.

-25/03/2002. Ingreso por infección valvular con colocación de una nueva válvula de derivación ventrículo-peritoneal.

-25/6/2002. TC de cráneo que muestra colapso del sistema ventricular por sobredrenaje valvular.

-2/12/2003. Ingreso por disfunción catéter distal de la válvula ventrículo-peritoneal.

-16/5/2006. TC cráneo pone de manifiesto dos válvulas, una en asta anterior de VL derecho y otra en asta posterior de VL derecho con catéter funcionando (lámina 43 D).

-29/05/2007. TC de cráneo muestra colapso del sistema ventricular (*slit ventricle*) o sobredrenaje valvular (como complicación tras la colocación de la válvula).

El estudio de los niveles de TNF α en el LCR muestra unos valores por encima de los controles (lámina 44 A). Cuando analizan los niveles en distintos momentos evolutivos, se encuentra un aumento significativo a los 8 meses, momento en el que se evidencia una disfunción de la válvula de derivación por sobredrenaje (lámina 44 B y C).

El LCR contiene una elevación de los niveles de lactato a los 8 meses en todas las determinaciones (lámina 45 A), que se correlaciona con las elevaciones en los niveles de TNF α . Los niveles de lactato se detectaron elevados respecto a los controles (lámina 45 B). Respecto al mioinositol, se encontraron niveles elevados en las muestras primera y tercera obtenidas los 8 meses (lámina 45 A). Los niveles de creatina no se encontraron elevados (lámina 45 B).

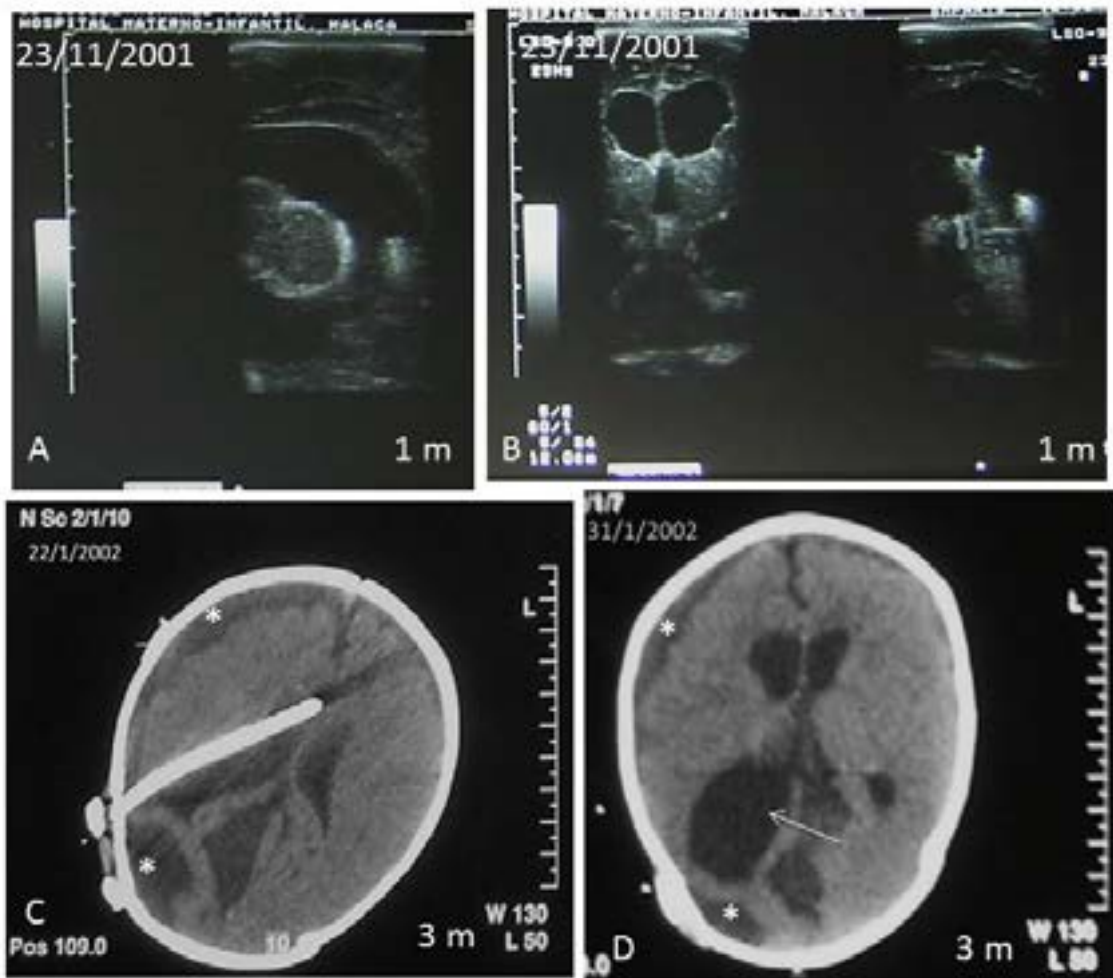


Lámina 42. Caso 2. Varón con estenosis de acueducto de Silvio. A y B. Ecografía transfotanelar que muestra dilatación de VL y III ventrículo tras un mes de vida. C y D. TC de cráneo en corte axial, mostrando la dilatación persistente del asta posterior de VL derecho (flecha) (D). Pequeño hematoma subdural crónico (*) a los tres meses de vida. En C aparece una línea blanca que corresponde al catéter proximal de la válvula de derivación ventrículo peritoneal alojada en el VL derecho.

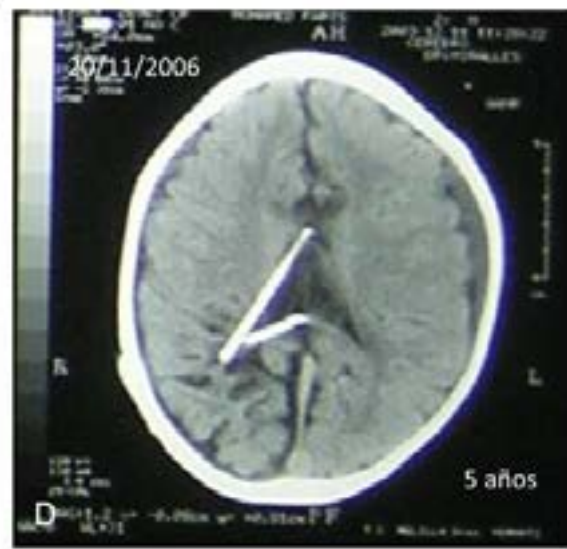


Lámina 43. Caso 2. Imágenes de TC de cráneo en corte axial en distintos momentos evolutivos (6 y 8 meses y 5 años). A y B. Se aprecia el asta posterior del VL derecho dilatado de forma persistente, lo que sugiere un ventrículo excluido. C. Los ventrículos muestran un tamaño pequeño indicador de un sobredrenaje de la válvula. D. Se pueden apreciar dos catéteres de derivación proximal alojados en VL derecho.

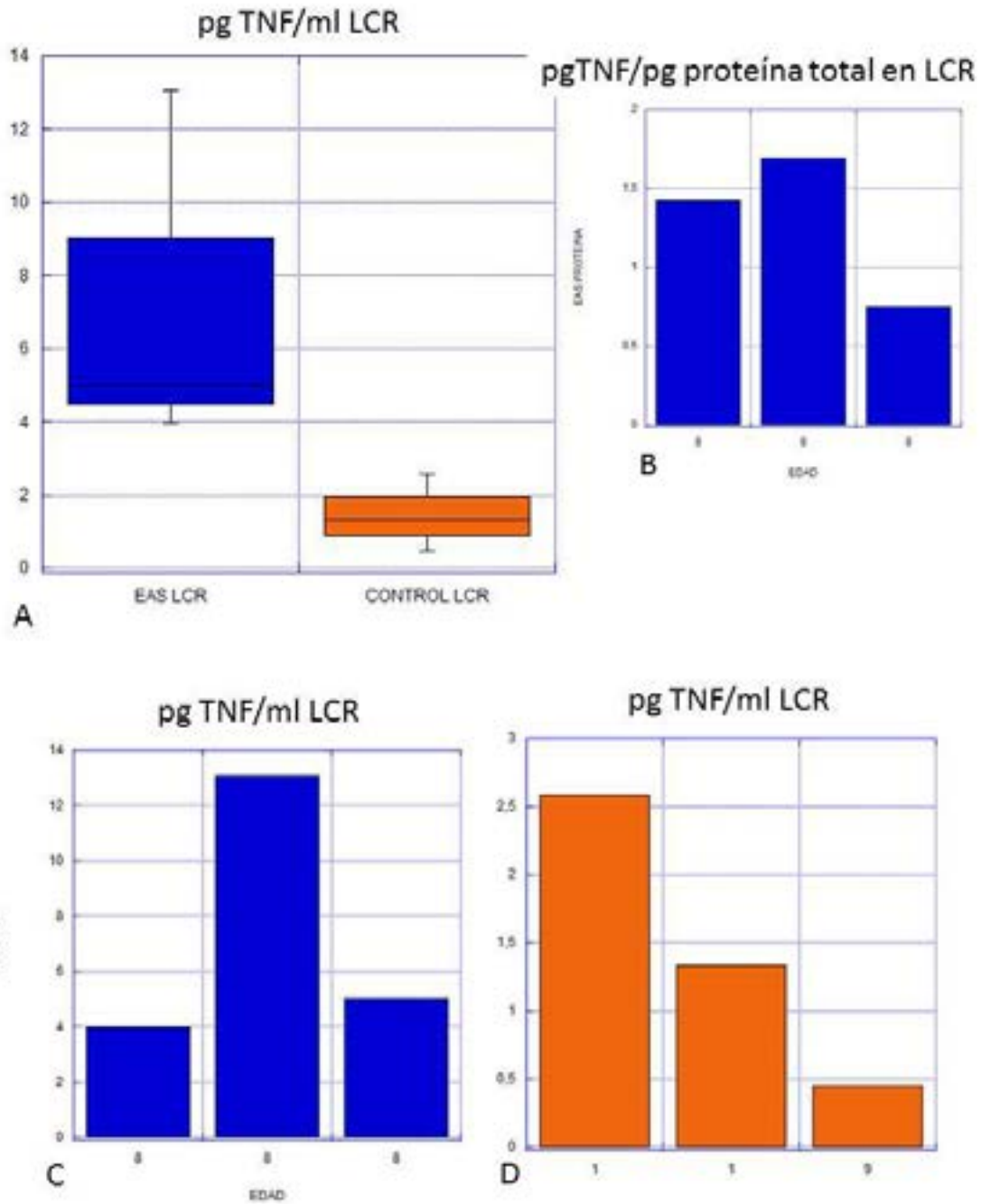


Lámina 44. Caso 2. Niveles de TNF α en el LCR. A. Diagrama de cajas. Comparativa entre los niveles encontrados en diferentes momentos y los controles. B y C. La gráfica muestra la variación de los niveles de TNF α en función de la edad. B. representa por microgramos de proteína y C por mililitro de LCR. D. variación de los niveles de TNF α en los controles según la edad. Las edades están representadas en meses para A-D.

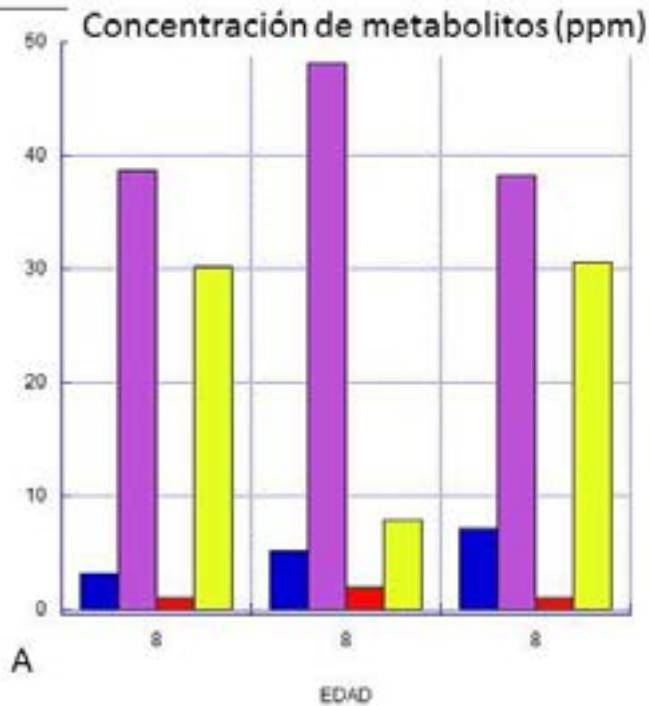
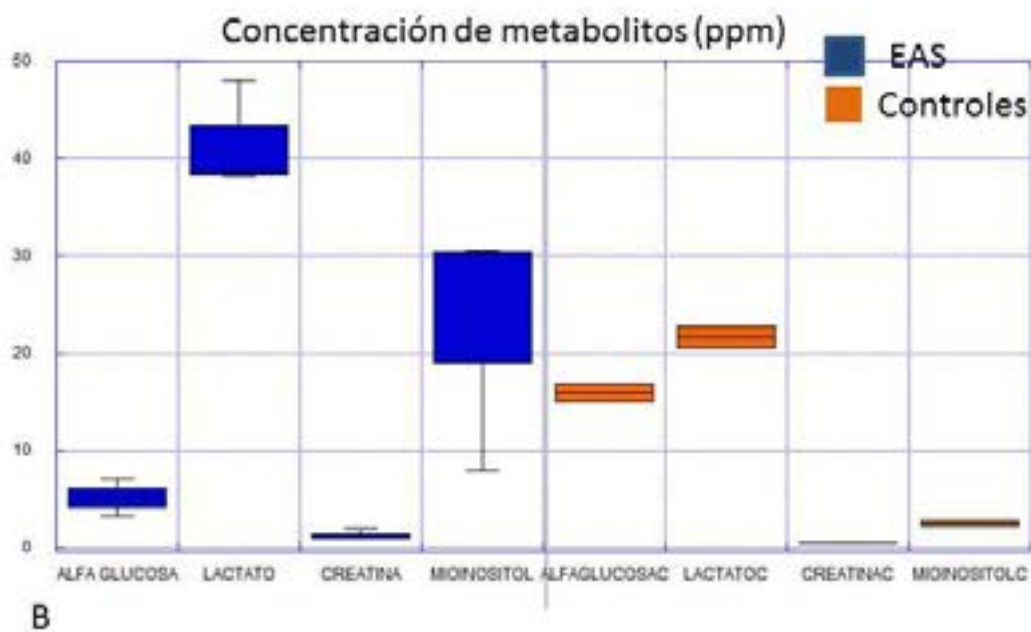


lámina 45. Caso 2. Niveles de metabolitos en el LCR (ppm) en función de la edad (meses). B. Diagrama de cajas. Comparación de los distintos metabolitos con respecto a los controles.



5.10.3 Caso 3. Masculino dehidrocefalia por mielomeningocele

-Fecha de nacimiento: 12/03/2002.

-Historial médico y diagnóstico:

-Se realiza derivación ventrículo peritoneal al nacimiento.

-7/6/2005. Ingresa por sospecha de infección de la válvula.

-9/6/2005. Ingreso para retirar la derivación ventrículo peritoneal, salvo fragmento catéter proximal adherido parénquima cerebral.

-30/11/2005. Ventriculostomía endoscópica por disfunción valvular.

-12/3/2008. RM de cráneo para control evolutivo. Se observa migración transependimaria de LCR en los ventrículos laterales. Ausencia de artefacto de flujo (lámina 46A).

-16/03/2008. Valoración neuroquirúrgica que muestra fallo diferido de la ventriculostomía.

-17/03/2008. Exploración endoscópica para reapertura de la ventriculostomía premamilar.

-16/04/2008. RM de cráneo con cambios secundarios frontales derecho tras ventriculostomía. Artefacto de flujo de 4.6 mm que muestra patencia de la ventriculostomía (lámina 46 B, C y D).

-22/10/2008. RM de cráneo que muestra una imagen quística frontal derecha posiblemente en relación con la retirada del catéter de ventriculostomía y la patencia de la ventriculostomía mostrando el artefacto de flujo en el suelo del tercer ventrículo (lámina 43 A y B).

-5/6/2009. RM de cráneo que muestra la ventriculostomía en el suelo del tercer ventrículo con el artefacto de patencia presente (lámina 47 C y D).

Cuando observamos los resultados de los niveles de $TNF\alpha$ en la hidrocefalia con mielomeningocele respecto a los controles observamos que están más altos. Si observamos la evolución en los niveles de $TNF\alpha$ en función de la edad, estos están más aumentados a los 4 meses aunque no disponemos de datos clínicos de ese momento (lámina 48).

En el estudio de metabólica las muestras a los 3 y 4 meses de vida muestran unos niveles altos de mioinositol y lactato, que se correlacionan con los niveles de $TNF\alpha$, y son mayores, sobre todo en el caso de mioinositol a los encontrados en el caso de estenosis de acueducto de Silvio (lámina 49).

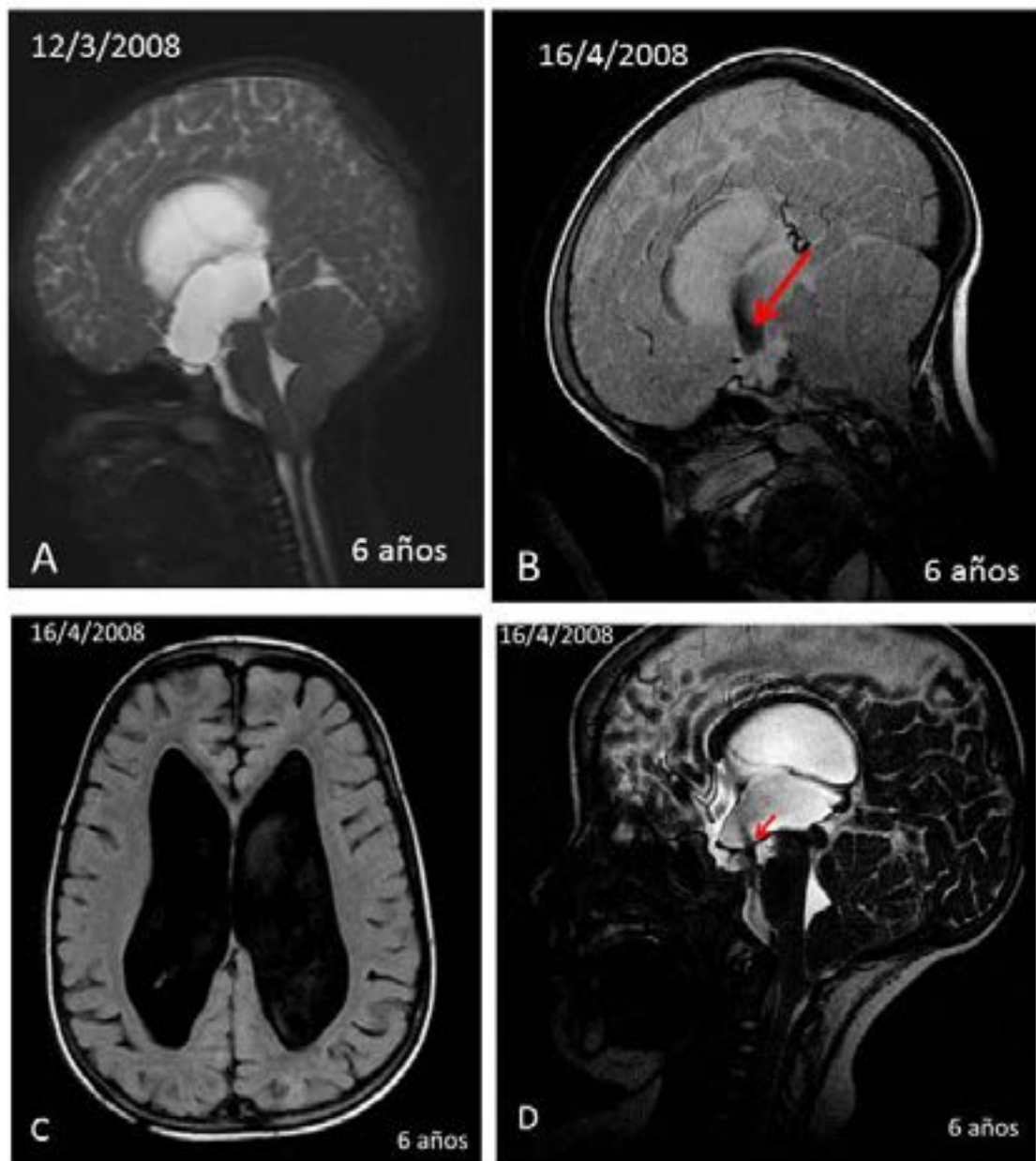


Lámina 46. Caso 3. Varón con mielomeningocele con 6 años de edad. A. Estudio sagital de RM potenciado en T2 donde se aprecian el III y el IV ventrículo. El III ventrículo está dilatado y redondeado en su porción anterior y el IV ventrículo es normal. B. imagen sagital potenciada en T1, la flecha roja muestra el artefacto de flujo en el suelo del III ventrículo tras la ventriculostomía. C. Imagen axial de RM potenciada en FLAIR que muestra la dilatación del sistema ventricular. No se evidencia edema transependimario ni pérdida de surcos. D. Imagen sagital potenciada en T1. La flecha roja muestra el artefacto de flujo en el suelo del III ventrículo.

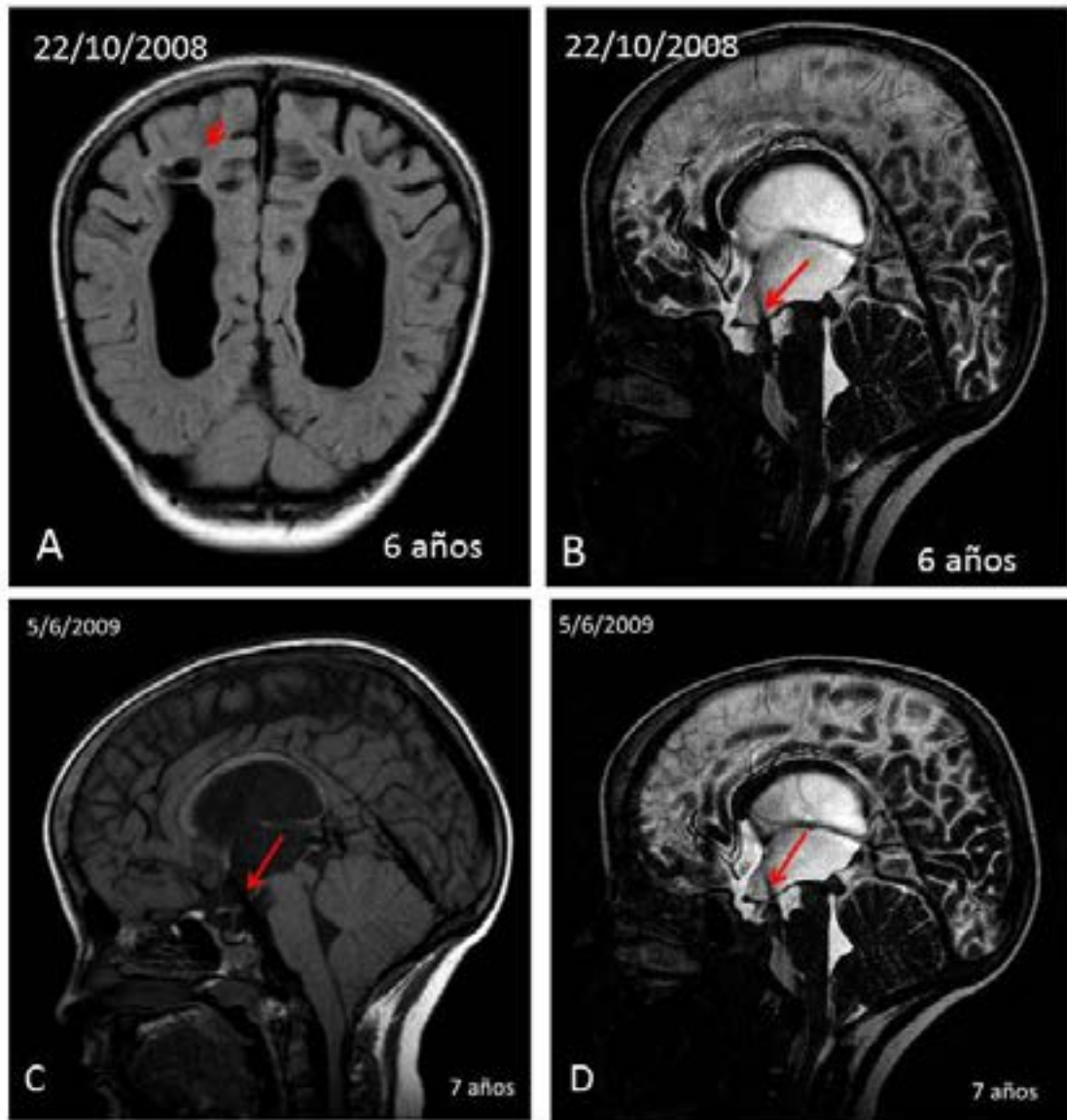


Lámina 47. Caso 3 a los 6 y 7 años de edad. A. Imagen de coronal de RM potenciada en FLAIR donde se observa la dilatación de los VL. La flecha roja muestra un quiste periventricular. B. Imagen sagital potenciada en T1 que muestra artefacto de flujo en suelo III ventrículo. C. Corte sagital potenciado en FLAIR que muestra el orificio en el suelo del III ventrículo. D. Corte sagital potenciado en T1. La flecha roja muestra artefacto en el suelo del III ventrículo.

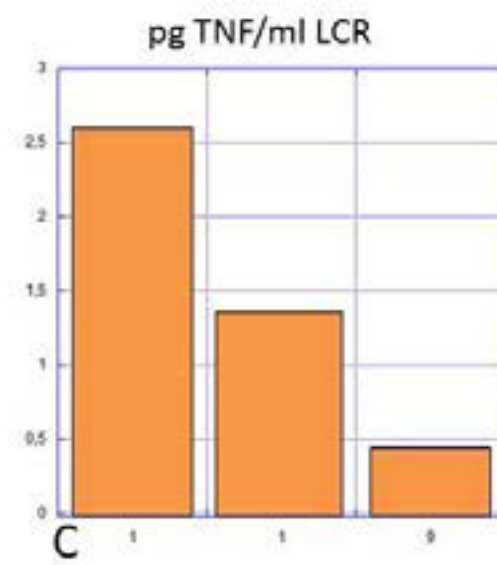
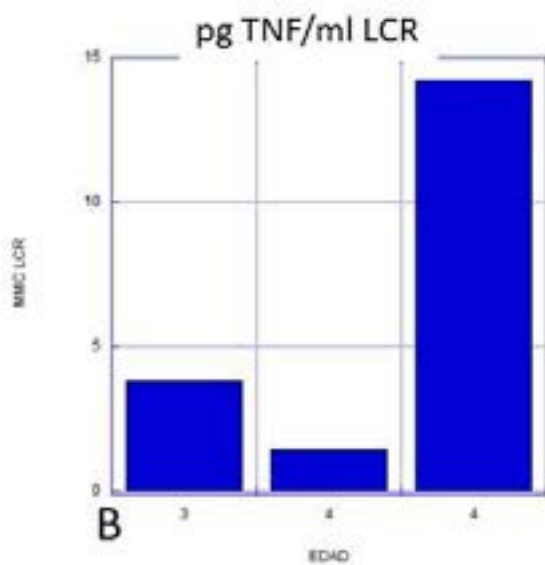
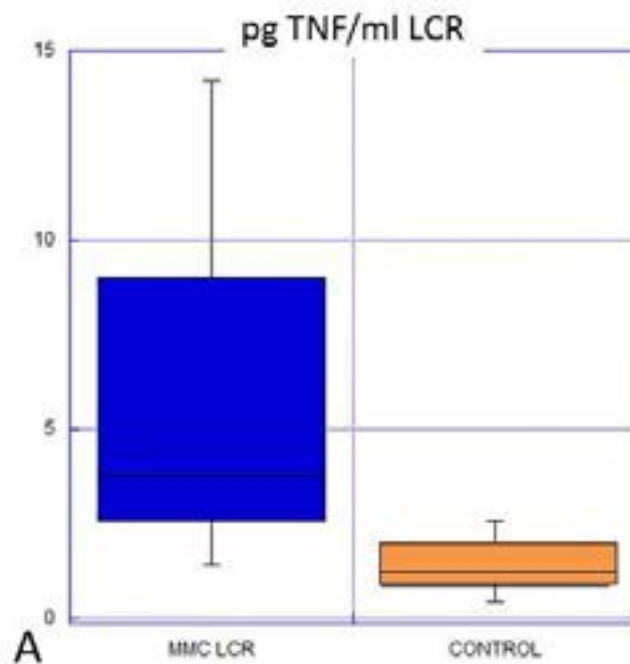


Lámina 48. Caso 3. Niveles de TNF α en el LCR. A. Diagrama de cajas. Comparativa entre los niveles obtenidos en diferentes momentos y los controles. B. La gráfica muestra como varían los niveles de TNF α en función de la edad (en meses). C. Variación de los niveles de TNF α en los controles según la edad (en meses).

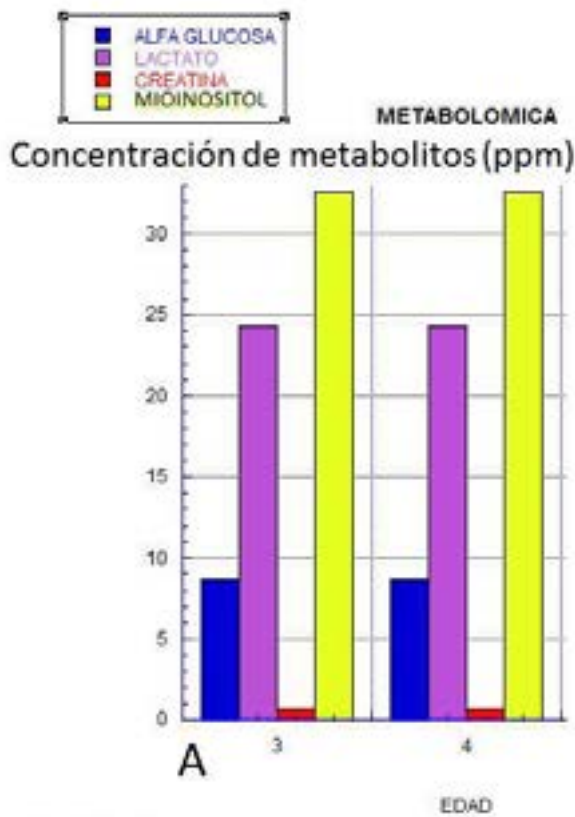
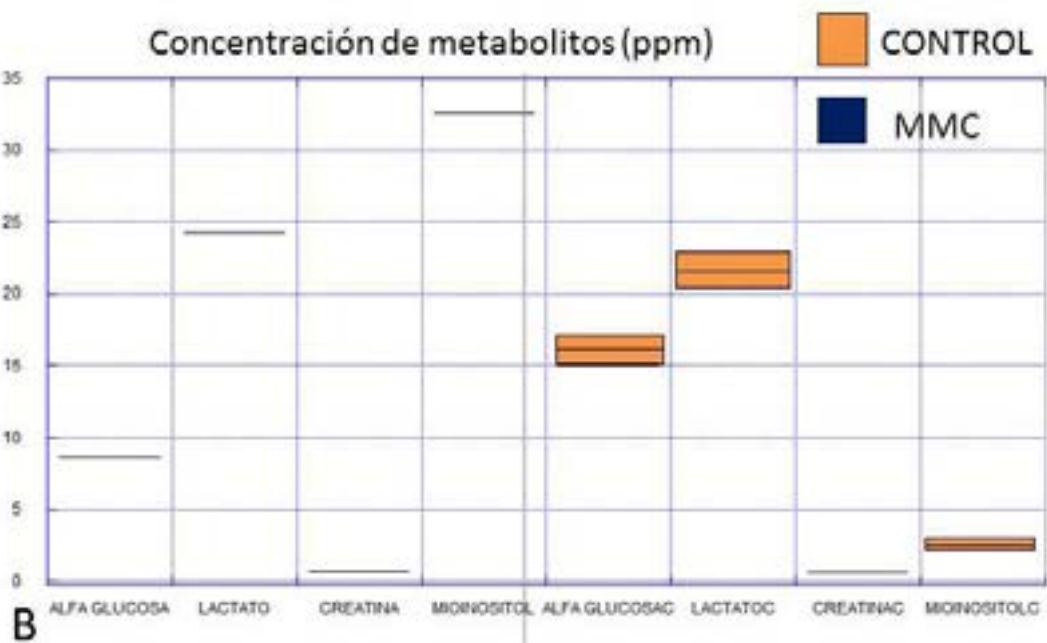


Lámina 49. Caso 3. Niveles de metabolitos en el LCR. A. Niveles en las distintas edades muestreadas (meses). B. Diagrama de cajas mostrando la concentración de los distintos metabolitos detectados en el caso respecto a los controles. Obsérvese valores muy similares de los distintos metabolitos en los dos comentarios evolutivos diferentes (a los tres y cuatro meses)



5.10.4 Caso 4. Femenino de hidrocefalia poshemorrágica y mielomeningocele

Fecha de nacimiento: 7/11/2001.

Historial médico y diagnóstico:

-Embarazo controlado en alto riesgo.

-Diagnóstico de mielomeningocele e hidrocefalia a los 7 meses por ecografía.

-Cesárea programada a las 36SG. PRN 2550 g. Convulsiones al nacer. Apgar 7/9. Ingresos en neonatología. Meningitis conatal y gran hernia umbilical. Estenosis pulmonar leve. Exploración hipotonía axial.

-7/11/2001. TC de cráneo manifestó una hidrocefalia masiva de ambos VL y III ventrículo. Múltiples cavidades poroencefálicas más llamativas en hemisferio izquierdo (frontal y parietal). Hemorragia izquierda (lámina 50 A, B y C, y 51 A)

-9/11/2001. TC de cráneo manifiesta encefalomalaciaplasmática con ventriculitis.

-12/11/2001. Ingreso en neurocirugía por sospecha de infección. Diagnóstico de hidrocefalia poshemorrágica. Se le realizó un drenaje externo y una punción ventricular.

-14/11/2001. Ingreso en neurología por convulsiones. Se inicia un tratamiento anticonvulsivante con Depakine© (valproato sódico).

-28/11/2001. Ingreso pos-sospecha de infección. Diagnóstico de ventriculitis por *Staphylococcus aureus*.

-7/12/2001. Ingreso en la Unidad de Neurocirugía del Hospital Materno-Infantil por disfunción valvular. Implantación de válvula de derivación ventriculoperitoneal, colocando el catéter proximal en ventrículo lateral derecho con mejoría de la hidrocefalia.

-6/2/2002. TC de cráneo mostró IV ventrículo de gran tamaño y ventrículo excluido (ventrículo no comunicado con el resto del sistema ventricular). Quiste en región anterior hemisferio derecho que desplaza la línea media. En la zona posterior de la cabeza se localiza la válvula de derivación. El Asta temporal de ventrículo lateral derecho está muy dilatada. El III ventrículo está también muy dilatado. Hemisferio izquierdo con gran dilatación del asta temporal del ventrículo lateral izquierdo. Quistes en hemisferio izquierdo. Migración transependimaria de LCR en la sustancia blanca periventricular (lámina 51 B).

-7/2/2002. Ingreso por hipertensión intracraneal. Se realiza punción de quiste frontal.

-22/2/2002. Ingreso para realizar derivación neuroendoscópica con perforación de los tabiques intraventriculares.

-19/4/2002. Ingreso pos-disfunción del catéter proximal. Recambio de catéter proximal derecho en quirófano.

-17/5/2002. Colocación de válvula de derivación ventrículo-peritoneal en ventrículo izquierdo (lámina 51 C).

-6/9/2002. RM de cráneo mostró atrofia parenquimatosa cerebral. Se detectan catéteres intraventriculares; el izquierdo presenta la punta en el asta frontal izquierda y el derecho en el asta frontal derecha. Cuidad quística temporoparietal izquierda que desplaza la línea media.

-16/9/2002. Revisión en consulta de neurología. El diagnóstico neurológico revela mejora en el comportamiento visual, sostén cefálico negativo, *clonus* y reflejo de Moro muy exaltado.

-25/9/2002. Revisión en oftalmología revela atrofia óptica bilateral.

-2/6/2003. Revisión en neurología diagnóstica epilepsia parcial sintomática.

-16/6/2003. Revisión en traumatología muestra ausencia de sostén cefálico. No fija la mirada. Tetraparesia espástica predominio derecho.

-6/8/2003. RM de cráneo revela una hidrocefalia tabicada con III y IV ventrículos excluidos. Importante atrofia de hemisferios cerebrales (lámina 52).

6/7/2004. RM de cráneo muestra el IV ventrículo excluido. Quistes poroencefálicos. III ventrículo con gran quiste en línea media. Válvulas de derivación en ambos ventrículos. Lóbulo frontal izquierdo con gran cuidad quística frontal.

-6/11/2006. Ingreso para intervención en la Unidad de Traumatología del Hospital Materno-Infantil. Se realiza una osteotomía varizante de cadera derecha y tenotomía aductores.

Los niveles de TNF α en este caso con hidrocefalía post-hemorragia y mielomeningocele aparecen similares a los controles. Con la edad tienden a disminuir, al igual que sucede en los controles (lámina 53).

En el estudio de metabólica las muestras al mes y dos meses de vida muestran unos niveles altos de lactato que está más alto en el primer mes que en el segundo y se correlaciona con los niveles TNF α detectados. El mioinositol se encuentra aumentado a los dos meses (lámina 54 A). Respecto a los controles como en el resto de los casos los niveles de α glucosa son inferiores a los controles y llama la atención un marcado aumento del lactato y del mioinositol (lámina 54 B).

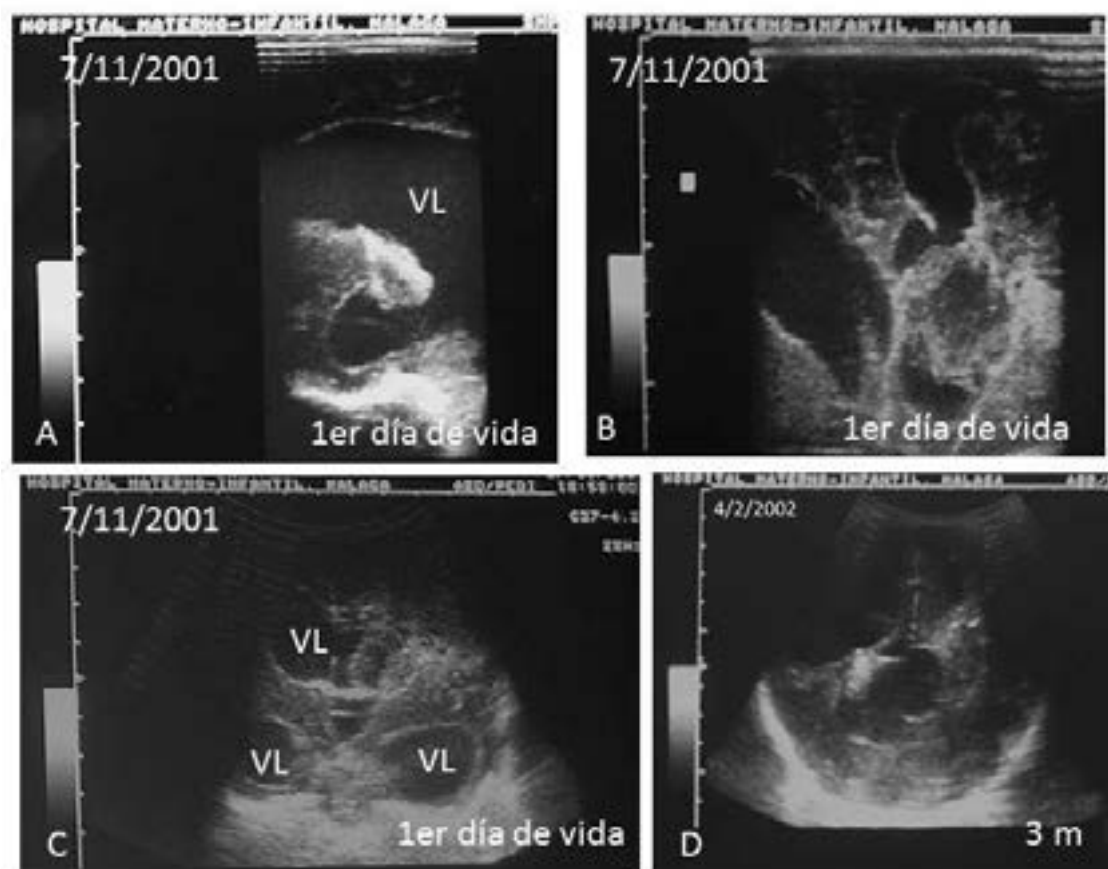


Lámina 50. Caso 4. Estudio mediante ecografía transfontanelar de paciente femenina con hidrocefalia poshemorrágica y mielomeningocele en el primer día de edad (A-C) y a los 3 meses (D). A. Corte sagital donde se aprecia una importante dilatación del VL. B. Corte coronal a nivel de astas ventriculares frontales de los VL donde se aprecia el izquierdo colapsado y con una alteración de su anatomía normal. C. Corte coronal a nivel de línea media mostrando desestructuración del VL izquierdo. D. Corte coronal a los tres meses de vida que pone de manifiesto la desestructuración del sistema ventricular.

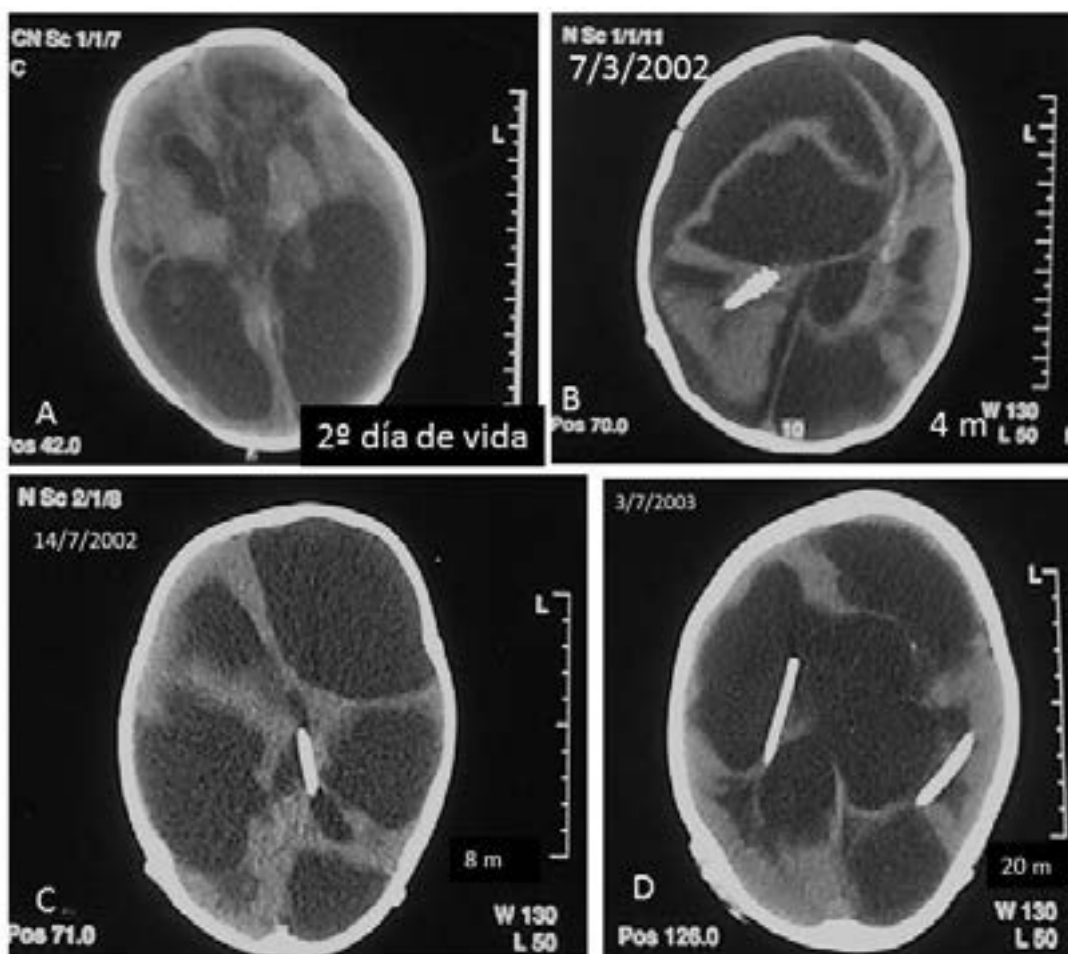


Lámina 51. Caso 4. Estudio mediante TC de cráneo en cortes axiales en el segundo día (A) de y a los 4 (B) y 20 meses (C y D). A. Existe una marcada dilatación del sistema ventricular con restos hemáticos a nivel frontal izquierdo con desestructuración del asta frontal del VL izquierdo. B, C y D. Se observa una hidrocefalia multiseptada con atrofia cortical marcada que va aumentando progresivamente con la edad del paciente. A los 20 meses ya dispone de dos catéteres proximales para mejorar el drenaje.

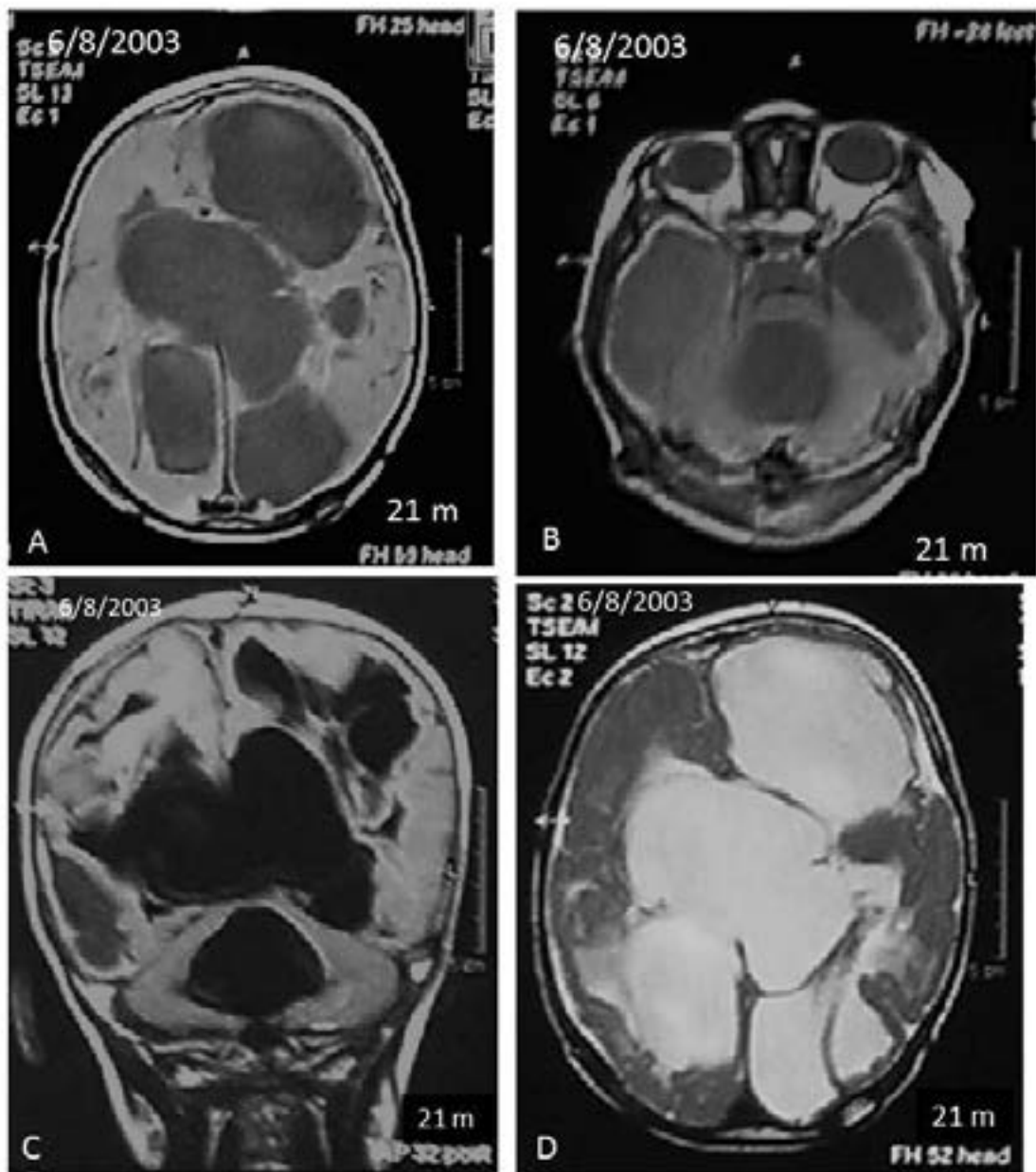


Lámina 52. Caso 4. Estudio mediante RM de cráneo en cortes axiales (A, B y D) y coronales (C) a los 21 meses de edad. A, B y C. Imagen potenciada en FLAIR que muestra una hidrocefalia multiseptada con pérdida de la anatomía cerebral y del sistema ventricular. Aparece una atrofia marcada de ambos lóbulos temporales con dilatación del asta temporal de los VL y del IV ventrículo. D. imagen potenciada en T2.

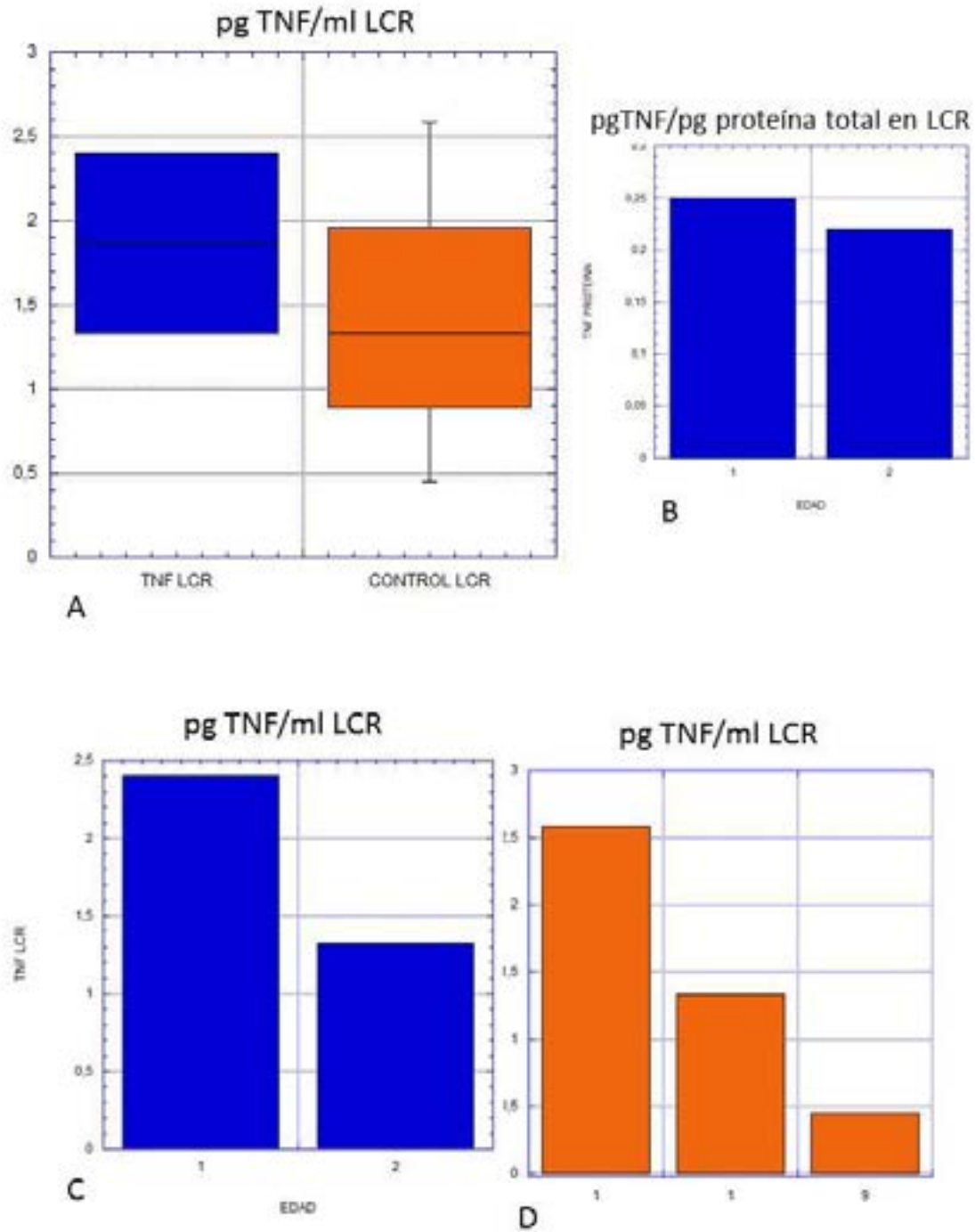


Lámina 53. Caso 4. Niveles de $\text{TNF}\alpha$ en el LCR. A. Diagrama de cajas. Niveles $\text{TNF}\alpha$ en el caso 4 en diferentes momentos en comparación con los controles. B y C. Variación de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ en función de la edad (en meses). D. Variación de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ en los controles según la edad (en meses).

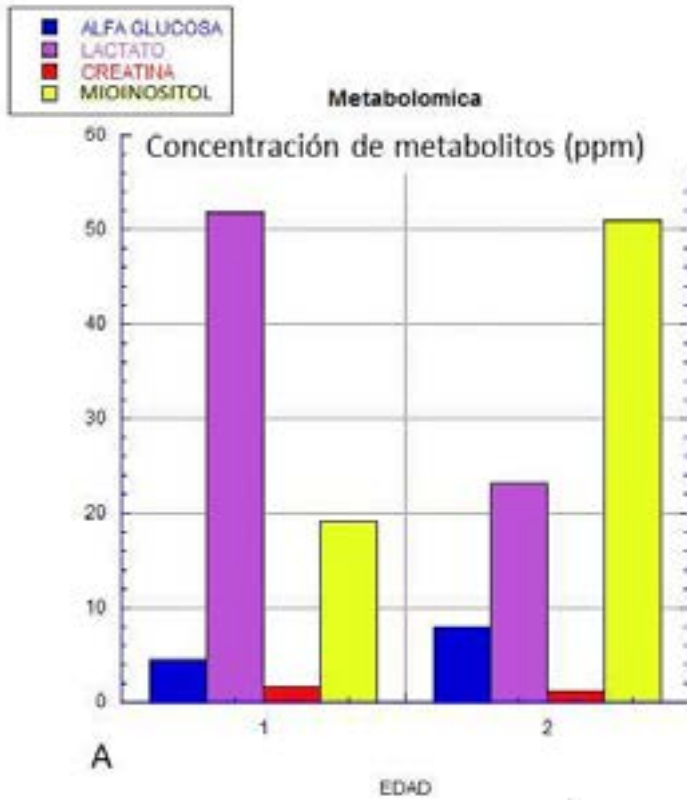
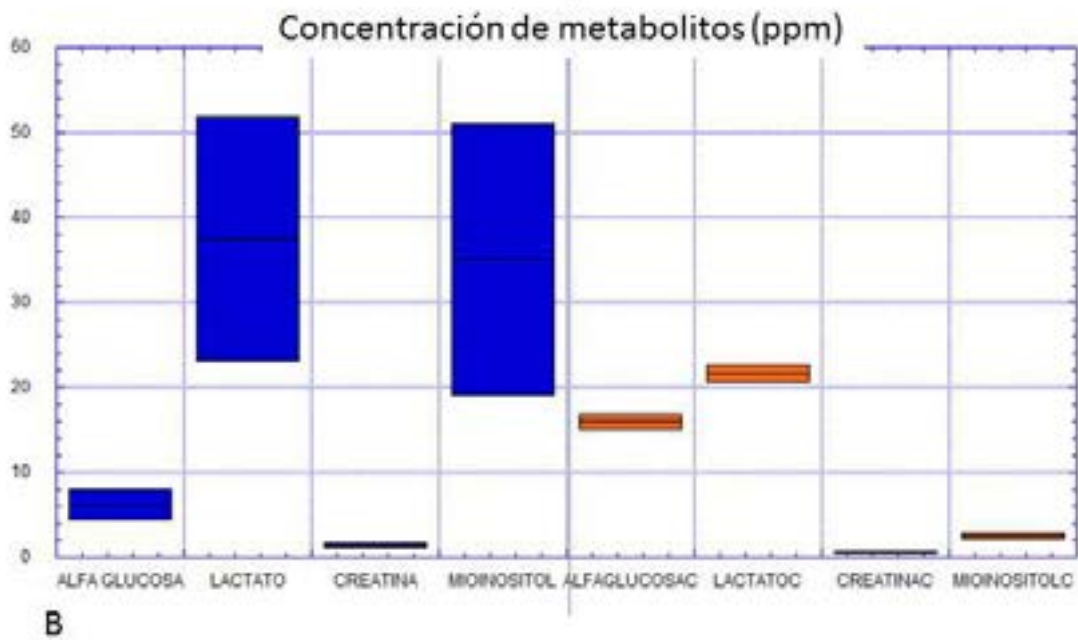


Lámina 54. Caso 4. Niveles de metabolitos en el LCR. A. Niveles de metabolitos en las dos edades muestreadas (en meses). B. Diagrama de cajas. Niveles de lo metabolitos en el caso en diferentes momentos con los respecto a los controles.



6. Discusión

6.1 Estado del epéndimo en los casos normales e hidrocefálicos

En el ser humano, al igual que en otros vertebrados, las células endimarias se diferencian a partir del neuroepitelio con un gradiente caudo-rostral. Esta diferenciación empieza en la cuarta semana de gestación y se completa aproximadamente a las 22SG (Sarnat 1992a; Sarnat 1992b). Como reflejo de la diferenciación del epéndimo, las proteínas estructurales tales como la vimentina, GFAP, y ciertas citoqueratinas, son expresadas por el epéndimo humano mostrando ese patrón temporal y espacial (Sarnat 1992a; Bruni 1998). Así, exceptuando los ventrículos laterales, el epéndimo expresa GFAP en el primer período de gestación. El epéndimo de los ventrículos laterales expresa GFAP en la segunda mitad de la vida fetal (a partir de las 22SG). La expresión de GFAP desaparece en las células endimarias maduras (40SG). En el momento del nacimiento, sólo unas pocas células endimarias del ventrículo lateral expresan GFAP (Sarnat 1992a), como que reflejan que el epéndimo de los ventrículos laterales es el último en completar su diferenciación. En los 18 casos estudiados, desde los estadios iniciales de la gestación, donde la ZV está formada por un neuroepitelio (12-16SG), hasta los fetos a término, donde observamos una monocapa de epéndimo multiciliado, (36-40SG), tanto en los casos normales como en los hidrocefálicos, la expresión de marcadores ha sido la descrita.

Hemos usado otros marcadores que pueden aportar una información más funcional, como es el caso de la proteína caveolina-1. Este es un marcador molecular de la endocitosis y transcitosis mediada por caveolas (Nichols and Lippincott-Schwartz 2001; Tuma and Hubbard 2003; Peruzzo et al. 2004). En el SNC de ratas adultas, la endocitosis mediada por caveolas se produce en todas las células endimarias ciliadas, en el epéndimo de los plexos coroideos y en los tanicitos (Peruzzo et al. 2004). Por ser considerada una molécula funcional clave, su expresión en el epéndimo inmaduro de los fetos más jóvenes estudiados en la presente Tesis Doctoral, indica que el complejo proceso de endocitosis/transcitosis comienza a operar en estas células en etapas tempranas de desarrollo del SNC. La ubicación que se ha encontrado en el presente trabajo, situada en los polos apical y basal de las células endimarias inmaduras y maduras, sugiere que estas células interiorizan compuestos del LCR y del espacio intercelular.

Entre las células endimarias de los plexos coroideos, tanto de los fetos controles como hidrocefálicos, no se encontraron diferencias morfológicas aparentes, ni en la cantidad ni en la distribución celular de caveolina-1.

Dado que la caveolina-1 es un marcador funcional clave, se puede afirmar que la endocitosis/transcitosis en el plexo coroideo de los fetos hidrocefálicos podría no estar aparentemente afectada. En nuestro equipo de investigación hemos descrito en los ratones mutantes hidrocefálicos *hyh*, que las células endimarias de los plexos coroideos no se denudan, a diferencia que lo que ocurre en las superficies ventriculares (Jiménez et al. 2001).

El presente estudio en casos humanos está de acuerdo con la ausencia de denudamiento de las células endoteliales que forman los plexos coroideos. Por tanto, los resultados encontrados apoyan aún más la idea de que existen características distintivas entre el epéndimo de los plexos y el epéndimo multiciliado que recubre la mayor parte de la superficie ventricular (Sarnat 1998; Wagner et al. 2003; Dominguez-Pinos et al. 2005).

6.2 Pérdida del epéndimo en fetos con hidrocefalia comunicante

En estudios anteriores de casos de hidrocefalia congénita humana, se han descrito discontinuidades en la capa de células epiteliales endoteliales que revisten las cavidades cerebrales, en particular en los ventrículos laterales (Page and Leure-duPree 1983; Sarnat 1995). Esta pérdida ha sido considerada en esos estudios como efecto resultante de la dilatación ventricular debido a la acumulación intraventricular de LCR y al aumento consecuente de la presión intraventricular (Page and Leure-duPree 1983; Sarnat 1995). Según Sarnat, la superficie ventricular que ha perdido el epéndimo se correlaciona con el grado de dilatación de los ventrículos laterales, concluyendo que las alteraciones del epéndimo en la hidrocefalia fetal humana y de la infancia temprana no son determinantes en la patogénesis de la enfermedad (Sarnat 1995).

En la presente investigación, llevada a cabo en necropsias de 18 fetos con diversos tipos de hidrocefalia, los ventrículos laterales han mostrado la existencia de una pérdida del epitelio endotelial. Tal fenómeno no se ha encontrado en ninguno de los 12 fetos no hidrocefálicos tomados como controles. Esto sugiere que en humanos la pérdida del epéndimo puede estar relacionada con el inicio y/o primeras etapas de la hidrocefalia. Esta posibilidad se refuerza por el hecho de que el feto hidrocefálico más joven estudiado (16SG), ya muestra una pérdida del neuroepitelio/ epéndimo. Las discontinuidades en el revestimiento endotelial de los fetos hidrocefálicos que se han encontrado muestran una asociación con la presencia de astrocitos reactivos en el subepéndimo, hecho que también ha sido descrito por Sarnat en casos humanos hidrocefálicos (Sarnat 1992b). Por contra, los presentes hallazgos en los fetos hidrocefálicos no están de acuerdo con los descritos por Dooling *et al.*, en su estudio de 111 cerebros de fetos humanos, donde describen la ausencia de defectos graves y la existencia de pequeñas áreas de pérdida endotelial focal sin prominente gliosis subendotelial (Dooling, Chi, and Gilles 1977). Estos autores sugieren que los defectos del epéndimo, que se presentan con mayor frecuencia en los primeros tres meses de gestación, eran el resultado de un proceso que tiene lugar durante la maduración cerebral. Sin información sobre la magnitud de las áreas denudadas y de la gliosis que ocurren en estas áreas, es difícil comparar sus hallazgos con los resultados de la presente Tesis Doctoral.

6.3 Defectos en el desarrollo del epéndimo pueden relacionarse con la hidrocefalia humana

En los fetos humanos hidrocefálicos estudiados de entre 16SG y tres meses postnatales, la pérdida del epéndimo se está produciendo durante todo el periodo estudiado y ya es visible a las 16SG. Desde la edad más temprana estudiada (16SG) ya es posible detectar áreas sin epéndimo, sin aparente reacción astrocitaria. El que se pierdan células de la ZV en estadios tan tempranos, plantea la cuestión de si el mecanismo que conduce a la pérdida del epéndimo inmaduro es el mismo mecanismo que opera en el desprendimiento del epéndimo maduro .

Investigaciones recientes llevadas a cabo en ratones mutantes como modelo de hidrocefalia congénita, tanto en nuestro equipo de investigación (Jiménez et al. 2001; Wagner et al. 2003), como por otros grupos (Sakakibara et al. 2002; Davy and Robinson 2003; Blackshear et al. 2003), han proporcionado pruebas sólidas de que la hidrocefalia congénita puede resultar de una alteración primaria del linaje de las células neuroepiteliales o ependimarias

En el ratón mutante *hyh*, que es un modelo animal de hidrocefalia congénita donde se puede seguir la perturbación del desarrollo del epéndimo, se ha demostrado que la pérdida del epéndimo aparece de una forma programada, que es paralela a su diferenciación y maduración, de modo que se produce en ciertos sitios y en momentos específicos del desarrollo (Jiménez et al. 2001). En el ratón *hyh*, existe una pérdida programada del epéndimo ventral (que se inicia en el IV ventrículo) que se produce a comienzos de la vida fetal y precede a la aparición de una hidrocefalia comunicante (Jiménez et al. 2001). Más tarde, la pérdida del epéndimo dorsal del acueducto cerebral, que ocurre después del nacimiento, conduce a la obliteración del acueducto y a desencadenar una hidrocefalia obstructiva grave (Wagner et al. 2003). El gen mutado en el ratón *hyh* corresponde a un gen que codifica para la proteína de unión al factor sensible a la etilmaleimida (α SNAP) (Chae et al. 2004; Hong, Chakravarti, and Takahashi 2004). La proteína α SNAP desempeña un papel clave en el transporte de proteínas entre compartimentos celulares, incluyendo el transporte hacia la membrana plasmática. Como consecuencia, los ratones *hyh* tienen alterada la distribución de proteínas de superficie en las células madre neurales del neuroepitelio, tales como E-cadherinas y β -catenina (Chae et al. 2004; Bajjalieh 2004). Parece muy probable que este defecto afecte a la diferenciación del linaje de células ependimarias del mutante *hyh* y, por tanto, sea la causa de la pérdida del epéndimo que ocurre en este ratón hidrocefálico (Jiménez et al. 2001; Wagner et al. 2003).

Otro de los modelos murinos que apoyan el papel del desarrollo del epéndimo en la etiología de la hidrocefalia ha sido el ratón mutante *hy3*, donde se afecta a la proteína hydin (Davy and Robinson 2003). Hydin es una proteína transmembrana que en el SNC se expresa exclusivamente en el epéndimo multiciliado (Davy and Robinson 2003). En otro modelo animal

(una línea de ratones que albergan una epoxigenasa transgénica cardio-específica), la interrupción del gen *msi1* (*Musashi RNA-Binding Protein 1*) se ha demostrado que provoca una diferenciación anormal de las células endimarias del acueducto cerebral, produciendo la estenosis del acueducto e hidrocefalia (Blackshear et al. 2003). Este gen está implicado en la codificación de una de las proteínas denominadas musashi, que intervienen en la unión al ARN para la regulación postranscripcional de genes. Dos de ellas, la *msi1* que está mutada en ese modelo animal, y la *msi2*, se expresan en células precursoras neurales y en todas las células endimarias.

6.4 Rosetas endimarias

Las rosetas endimarias han sido descritas previamente como respuestas defectuosas de la reparación en daños traumáticos producidos en la médula espinal y en el acueducto en la hidrocefalia (Bruni 1998). También han sido encontradas en otro estudio con fetos humanos hidrocefálicos donde, entre otros orígenes, se ha sugerido una diferenciación *in situ* del propio neuroepitelio dentro del parénquima (Sarnat 1995; Dominguez-Pinos et al. 2005). Tres casos de fetos humanos hidrocefálicos de 16, 32 y 40SG, estudiados en la presente Tesis Doctoral, manifiestan la presencia de rosetas subendimarias en los ventrículos laterales (Dominguez-Pinos et al. 2005). Existen evidencias experimentales que sugieren que las rosetas pueden ser debidas a alteraciones en el desarrollo y en la formación del epéndimo.

El bloqueo inmunológico de la molécula de adhesión N-cadherina en embriones de pollo (mediante una única inyección de un anticuerpo bloqueante en el LCR) resulta en la existencia de áreas desprovistas de epéndimo y en la formación progresiva de rosetas endimarias en la ZSV (Gänzler-Odenthal and Redies 1998). Por lo tanto, el bloqueo inmunológico de la N-cadherina y las rosetas podrían estar relacionados, de forma que la roseta puede ser el resultado de un defecto primario en el desarrollo del epéndimo, expresado en la ZSV.

El hecho de que los fetos humanos estudiados en nuestro grupo presenten rosetas con una expresión diferencial de GFAP (positiva) y vimentina (negativa), respecto al epéndimo que recubre la superficie ventricular, indica que las rosetas pueden representar un epéndimo en un estado previo de diferenciación a pesar de formar un monocapa de células ciliadas. Esta expresión diferencial en los marcadores GFAP y vimentina podría reflejar un defecto en el proceso de diferenciación endimaria relacionado con la aparición de la hidrocefalia.

Sarnat ha encontrado que en fetos humanos y recién nacidos con malformaciones de Chiari II y estenosis del acueducto cerebral, existen rosetas subendimarias que expresan vimentina en la zona del cuarto ventrículo (Sarnat 2004). También ha descrito un aumento de la expresión de vimentina en el epéndimo de forma focal en áreas de disgenesia, como son, el acueducto, el IV ventrículo, y el canal central de la médula espinal, pero no en el epéndimo de los ventrículos laterales (Sarnat 2004). Estas observaciones no pudieron ser confirmadas en la

presente investigación, ya que no se pudo establecer si los 3 casos estudiados de hidrocefalia asociada con mielomeningocele lumbo-sacro eran compatibles con una malformación de Chiari II. De cualquier modo, los resultados del estudio de Sarnat pueden poner de manifiesto la existencia de defectos en el desarrollo del epéndimo en relación con la etiología de la hidrocefalia.

Otra posibilidad podría ser que las células ependimarias cambiaran la expresión de marcadores al estar localizadas en la ZSV de forma que la expresión de GFAP y vimentina estuviese modificada como mecanismo adaptativo a esta nueva localización.

6.5 Consecuencias de la desaparición del epéndimo en la evolución de la hidrocefalia

En el sistema ventricular existen regiones donde su estrechez constituye un riesgo de obliteración y, por tanto, de generación de la hidrocefalia obstructiva. Entre ellas, se incluyen el acueducto de Silvio, los forámenes de Monro o interventriculares, los forámenes de Luschka y Magendie, y el canal central de la médula espinal. La oclusión del canal central medular aumenta en la infancia y especialmente en la adolescencia y es omnipresente en adultos humanos (Milhorat, Kotzen, and Anzil 1994) y no tiene ninguna consecuencia adversa aparentemente. En los fetos humanos, el acueducto normal tiene una apertura amplia que se extiende antero-posteriormente, más o menos triangular o con forma de diamante (Bickers and Adams 1949; Woollam and Millen 1953; Emery and Staschak 1972).

Nuestros hallazgos en el presente estudio apoyan la hipótesis de que en el humano la alteración del epéndimo también podría preceder a la aparición de la hidrocefalia, y su agravamiento en forma obstructiva, en etapas tempranas del desarrollo, cuando la hidrocefalia es moderada y comunicante. Se han descrito evidencias que indican este tipo de posibilidad en la etiología de la hidrocefalia congénita en el ratón *hyh*, y que por tanto apoyan la hipótesis. En los ratones *hyh* se ha encontrado que la ausencia del epéndimo aparece en estados con hidrocefalia comunicante moderada y que, como consecuencia, la fusión de paredes ventriculares en el acueducto cerebral, es la razón por la que se ocasiona el agravamiento de la hidrocefalia en su forma obstructiva (Wagner et al 2003). Sin embargo, averiguar la causa (sobre una base genética) de la pérdida primaria del epéndimo, observada en los 18 fetos humanos estudiados, cuya hidrocefalia está relacionada con diferentes etiologías, es más difícil.

6.6 Papel de las reacciones gliales en la hidrocefalia

En ratas, ya sea en modelos con hidrocefalia congénita obstructiva (rata modelo *H-Tx*, *hydrocephalic Texas rat*) u obstructiva adquirida (ratas tratadas con caolina intraventricular), se ha descrito que la dilatación de los ventrículos cerebrales y el aumento de la presión intraventricular, tiene efectos nocivos en el parénquima cerebral conduciendo a la aparición de edema y estrés oxidativo (Socci et al. 1999), daños proteolíticos en la sustancia blanca (Del Bigio 2000), muerte celular y cambios reactivos en las células gliales (Del Bigio and Zhang 1998). Algunas de estas alteraciones también han sido mostradas en casos de hidrocefalia congénita humana (Del Bigio, Wilson, and Enno 2003). Bajo estas condiciones anormales, el SNC activa mecanismos que tratan de reestablecer la homeostasis aunque de forma parcial (Johanson et al. 2008). El aumento de la presión intraventricular y/o la presencia de las condiciones mencionadas, se asocia con reacciones astrogliales y microgliales.

En la hidrocefalia obstructiva presente en modelos animales de forma adquirida posnatalmente (Khan, Enno, and Del Bigio 2006; Lopes, Slobodian, and Del Bigio 2009; Deren et al. 2010; Xu et al. 2012), o congénita (Páez et al. 2007), se ha demostrado que tienen lugar reacciones astrocitarias en la corteza cerebral. En ratas con hidrocefalia obstructiva inducida experimentalmente, tales reacciones disminuyen si se les realizan derivaciones ventriculares del LCR y, por tanto, disminuye la presión intracerebroventricular (Miller and McAllister 2007). La reacción de los astrocitos ante lesiones del SNC se caracteriza por su hipertrofia e hiperplasia celular. Existen numerosos estudios que han puesto de manifiesto que las reacciones astrocitarias inhiben la regeneración axonal (Bovolenta, Wandosell, and Nieto-Sampedro 1992), pero en otros también se han asociado con la secreción de factores de crecimiento y factores tróficos (Hatten et al. 1991; Eddleston and Mucke 1993; Ridet et al. 1997; Renault-Mihara et al. 2008), tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que promueven el nuevo crecimiento axonal (Renault-Mihara et al. 2008). Por ello, se ha sugerido que la reacción astrocitaria inicialmente protege el tejido cerebral y contribuye a su recuperación funcional (Giaume et al. 2007). Por lo tanto, las consecuencias funcionales beneficiosas y perjudiciales de estas reacciones astrogliales son objeto de debate (Sofroniew 2005; Miller and McAllister 2007; Sofroniew and Vinters 2010).

Las reacciones astrocitarias en la hidrocefalia han sido consideradas perjudiciales y, por ello, como posibles dianas terapéuticas (Xu et al. 2012). Con ese objetivo, experimentalmente se ha logrado atenuar la reacción astrocitaria en ratas con hidrocefalia adquirida mediante fármacos anti-inflamatorios (McAllister and Miller 2010).

En los fetos de mayor edad gestacional (36-40SG), hemos encontrado en todos los casos que existe un aumento del número de células de la microglia/macrófagos en la ZSV de las áreas denudadas, aunque el significado funcional de este hallazgo es difícil de precisar. Las

células microgliales, además de ser fagocíticas, tienen múltiples funciones (Spranger and Fontana 1996). Se ha mostrado que regulan la proliferación astrocitaria en la formación de la barrera astrocitaria (Giulian and Lachman 1985), y en la rata mutante hidrocefálica H-Tx la regulación hacen que aumente la proliferación astrocitaria cuando existe un aumento del tamaño ventricular (Mangano et al. 1998).

En el presente estudio se ha encontrado que la falta de epéndimo recubriendo la superficie ventricular se sustituye por una reacción astrocitaria que forma una nueva interfase entre el parénquima nervioso y el LCR ventricular. Este fenómeno también ha sido descrito por otros investigadores en fetos humanos hidrocefálicos (Sarnat 1995; Sival et al. 2011). En los ratones hidrocefálicos *hyh*, el programa de pérdida de epéndimo comienza temprano en la vida fetal, terminando al final de la primera semana posnatal; el epéndimo que falta se sustituye por una capa de astrocitos que formarán una nueva superficie entre el LCR y el parénquima nervioso (Wagner et al. 2003; Páez et al. 2007; Jiménez et al. 2009). En el modelo murino *hyh*, se ha establecido que los astrocitos desempeñan un papel clave en la reparación de las áreas que han perdido el epéndimo (Wagner et al. 2003; Paez et al. 2007). De hecho, los astrocitos proliferan, migran a las paredes desnudas, cambian su fenotipo (expresan vimentina normalmente expresada sólo por el epéndimo), y forman una barrera parecida a la barrera endotelial (Paez et al. 2007; Roales-Bujan et al. 2012). Además, transcurren unos días entre el desprendimiento endotelial y el revestimiento astrogliar de la superficie expuesta (Wagner et al. 2003). Esto podría explicar el hecho de que el caso más joven de hidrocefalia fetal humana en el presente estudio (16SG) no presente astrocitos en el área que ha perdido el epéndimo. En cambio, en fetos de más edad (36-40SG), estas áreas estaban ocupadas por astrocitos reactivos. Se puede sugerir que, en la hidrocefalia fetal humana, el proceso para reparar las zonas que han perdido el epéndimo se lleva a cabo durante la vida fetal.

6.7 Papel que puede desempeñar la reacción astrocitaria en la hidrocefalia

El presente estudio ha revelado que la nueva capa superficial formada por los astrocitos, comparte algunas características fenotípicas y funcionales con el epéndimo al que sustituye. Esta evidencia sugiere que la reacción astrocitaria puede representar un intento de restablecer algunas funciones perdidas de la ZV cuando ha perdido el epéndimo, formando una nueva barrera entre el tejido cerebral y el LCR, consideramos que estos hallazgos son muy importantes.

El epéndimo multiciliado es una capa epitelial interpuesta entre el LCR y el parénquima cerebral. No se comporta como una barrera hermética (Brightman 1965a; Brightman 1965b), y parece regular el transporte de iones, moléculas pequeñas y agua (Bruni 1998; Hong-Wei

Wang et al. 2010). Las uniones estrechas están ausentes o mal desarrolladas en el epéndimo multiciliado maduro (Brightman 1965a; Bruni 1998).

Según nuestros estudios realizados en el ratón hidrocefálico *hyh*, cuando se inyecta intraventricularmente lantano o peroxidasa de rábano, los espacios extracelulares que rodean al epéndimo que permanece y las células astrocitarias que cubren las superficies sin epéndimo no presentan un sellado hermético (Roales-Buján et al. 2012). Así, el trazador se mueve por el espacio intercelular y penetra hasta la ZSV.

En los casos de fetos humanos del presente estudio, se ha encontrado que las distintas zonas de la superficie ventricular presentan diferentes grados de reacciones astrocitarias. Ese mismo tipo de evidencia también ha sido descrita en el ratón *hyh* (Paez et al. 2007; Roales-Buján et al. 2012). Se desconocen cuáles son las señales que median estos distintos grados de reacción astrogliol.

En los ratones *hyh*, la pérdida del epéndimo tiene lugar en etapas prenatales previas a la hidrocefalia clínicamente significativa (Jiménez et al. 2001), por consiguiente, la presión intraventricular o la expansión los ventrículos no pueden ser consideradas responsables de la ausencia de epéndimo en estos ratones. Del mismo modo, se ha descrito en los ratones *hyh* que la reacción astrocitaria periventricular aparece poco después de la denudación. La astrogliogénesis, aparece en una etapa en la que la ventriculomegalia está empezando a desarrollarse (Paez et al. 2007). Además, la capa de astrocitos más gruesa es la que recubre el suelo del cuarto ventrículo denudado, una cavidad donde no existe dilatación (Roales-Buján et al. 2012). El mecanismo subyacente a la formación de la capa de astrocitos, que reemplaza al epéndimo perdido, no se conoce. No se sabe si es la ausencia de epéndimo o la exposición directa de la ZSV al LCR, o un efecto mecánico del aumento de tamaño de los ventrículos involucrados (Roales-Buján et al. 2012).

En el ratón *hyh*, se ha descrito que los astrocitos se encuentran en las paredes ventriculares de los ventrículos laterales que han perdido el epéndimo, formando una nueva capa de células que en varios aspectos se asemeja al epitelio endocelular; es decir, que expresan vimentina, carecen de uniones estrechas, muestran uniones de acoplamiento (tipo *gap*) con conexina-43, proyectan numerosas microvellosidades al ventrículo y muestran numerosas interdigitaciones laterales, formando un espacio intercelular sinuoso. La existencia de las uniones de acoplamiento entre las células endocelulares ha sido ampliamente demostrada (Brightman 1965a; Brightman 1965b; Jarvis and Andrew 1988; Bouillé et al. 1991; Gabrion et al. 1998), y se cree que desempeñan un papel en la sincronización del movimiento ciliar (Rodríguez, Blázquez, and Guerra 2010; Sival et al. 2011). La función de las uniones de acoplamiento en la capa de astrocitos se desconoce; podrían estar asociadas con actividades eléctricas y metabólicas, la determinación del fenotipo de células (Kettenmann and Ransom 2013), o la eliminación de moléculas citotóxicas y la difusión de factores neuroprotectores que tienen lugar en las lesiones cerebrales como la isquemia o la hipoxia (Lin et al. 1998; Rouach et al. 2002; Sofroniew 2005; Nakase, Yoshida, and Nagata 2006; Talhouk et al. 2008; Jäderstad, Brismar, and Herlenius 2010;). Cualquiera que sea el significado funcional de las uniones comunicantes que conectan los astrocitos que cubren la superficie ventricular sin epéndimo,

puede sugerirse que estas células están acopladas para desempeñar una función de barrera entre el LCR y el parénquima nervioso, estando involucrada en el transporte de agua y solutos.

La reacción periventricular que hemos encontrado en nuestro estudio, al igual que se ha descrito para ratones hidrocefálicos, podría representar un intento de restablecer el equilibrio entre el LCR ventricular y los fluidos del parénquima cerebral, o para ayudar a transporte de las sustancias entre el LCR de los ventrículos y los capilares del SNC (Roales-Buján et al. 2012).

Se ha descrito que las células endimarias son capaces de incorporar proteínas del LCR por una vía de pinocitosis-lisosoma (Del Bigio 1995). El epéndimo expresa caveolina-1, tanto en ratones normales como en las zonas de epéndimo preservadas en ratones *hyh* hidrocefálicos, con un patrón de expresión similar al antígeno EEA1, que es un marcador fiable de endosomas tempranos en el epéndimo (Roales-Buján et al. 2012). Los endosomas tempranos son compartimentos celulares dinámicos que están implicadas en la endocitosis y otros mecanismos (Jovic et al. 2010; Weisz and Rodriguez-Boulan 2009). La caveolina-1 es una proteína que está presente en las caveolas, estructuras que desempeñan un papel en la endocitosis y transcitosis (Frank et al. 2003; Gosens et al. 2008). En los ratones normales e hidrocefálicos *hyh*, la caveolina también está presente tanto en el epéndimo (Peruzzo et al. 2004; Rodríguez, Blázquez, and Guerra 2010; Roales-Buján et al. 2012), como en los astrocitos reactivos (Roales-Buján et al. 2012). Aunque la endocitosis a través de las caveolas es en fase fluida, algunos compuestos entran en las caveolas a través de receptores específicos (Tuma and Hubbard 2003). La presencia de caveolas en el epéndimo apoya la capacidad conocida de las células endimarias para incorporar moléculas presentes en el LCR (Brightman 1965a; Brightman 1968). En los astrocitos reactivos, las caveolas pueden desempeñar un papel similar, facilitando la endocitosis y otros mecanismos similares (Weisz and Rodriguez-Boulan 2009; Jovic et al. 2010). Tanto para el caso de los ratones *hyh* como para los fetos hidrocefálicos estudiados en la presente Tesis Doctoral, en los astrocitos reactivos, a diferencia del epéndimo, no existe una distribución polarizada de las caveolas y los endosomas, lo que indica que podrían incorporar fluido y sustancias no sólo desde el ventrículo sino también desde el fluido extracelular del parénquima nervioso.

La acuaporina 4 es un canal de agua con marcada prevalencia en las áreas periventriculares del SNC (Venero et al. 2001). En las células endimarias se localiza en los dominios latero-basales (Rash et al. 1998; Roales-Buján et al. 2012) y, menos extensamente, en el dominio apical (Roales-Buján et al. 2012). Se ha propuesto que la acuaporina 4 presente en el epéndimo, desempeña un papel protector en la hidrocefalia, permitiendo la reabsorción trans-endimaria de LCR en los capilares cerebrales (Skjolding et al. 2010). La presencia de acuaporina 4 en la membrana plasmática apical de las células endimarias apoya esta posibilidad. Por ello, se ha propuesto que la acuaporina 4 puede tener un papel relevante en la hidrocefalia y podría constituir un objetivo terapéutico en el futuro (Mao, Enno, and Del Bigio 2006; Shen et al. 2006; Oowler, Pitham, and Wang 2010; Skjolding et al. 2010; Paul et al. 2011). En los astrocitos del parénquima nervioso, en condiciones normales, la acuaporina 4 se encuentra sobre todo en sus pies vasculares (Rash et al. 1998; Roales-Buján et al. 2012). En contraposición, los astrocitos reactivos que recubren las zonas con ausencia de epéndimo en

los fetos humanos estudiados en la presente Tesis, parecen sobreexpresar acuaporina 4, encontrándose en todo su cuerpo y prolongaciones celulares. La presencia de acuaporina 4 en los astrocitos reactivos se ha propuesto que participa en la entrada de agua en los astrocitos en las etapas iniciales de la formación de edema periventricular (Nase et al. 2008), funcionando para restablecer el equilibrio osmótico (Vizuet et al. 1999). En los fetos hidrocefálicos estudiados por nosotros, al igual que se ha sugerido para los ratones *hyh* hidrocefálicos, la presencia de acuaporina 4 en los astrocitos podría estar relacionada con un intento de atenuar el edema y las condiciones a ambos lados de la interfase parénquima nervioso/ LCR (Roales-Buján et al. 2012).

6.8 Astrocitos reactivos y producción de TNF α

En las necropsias de fetos humanos analizadas en el presente estudio, que presentaban diferentes formas de hidrocefalia primaria, se ha detectado la presencia del factor TNF α en los astrocitos reactivos periventriculares y en las células microgliales. Esto sugiere que en humanos con hidrocefalia primaria, el TNF α también se relaciona con la reacción glial.

Sólo existe un estudio previo reciente sobre el posible papel del TNF α en la hidrocefalia congénita humana, donde se han investigado los niveles de TNF α en el LCR de diferentes formas de hidrocefalia, incluyendo la fetal, la de inicio tardío y la hidrocefalia poshemorrágica (Naureen et al. 2014). En ese estudio, las diferencias encontradas no fueron significativas en comparación con los controles. En la presente Tesis Doctoral se han estudiado los niveles de TNF α en el LCR en los casos con diferentes formas de hidrocefalia, incluyéndose el muestreo múltiple en casos de hidrocefalia obstructiva y de origen poshemorrágico con disfunción en el drenaje. La presencia de niveles más elevados de TNF α puede ser explicada como: a) una acumulación de la citoquina en el ventrículo debido a un fallo en el drenaje; b) una respuesta a la infección en el sistema de drenaje; o c) una respuesta del parénquima a una presión muy alta, que puede estar relacionada con la presencia de isquemia a nivel cortical.

Por otro lado, en pacientes adultos con hidrocefalia normotensiva de diferentes causas, Tarkowski y colaboradores (Tarkowski et al. 2003), han encontrado niveles muy altos de la citoquina, lo que les ha permitido considerarla como un posible biomarcador de la enfermedad. Por contra, otros autores, no han encontrado este tipo de diferencias en casos de ancianos con hidrocefalia normotensiva idiopática, respecto a los controles (Leinonen et al. 2011).

El TNF α es una citoquina multifuncional que ejerce una amplia gama de funciones pleiotrópicas, tales como las respuestas proliferativas a la inflamación, la mediación de la respuesta inmune y la muerte celular (MacEwan 2002). El TNF α tiene dos formas activas: una de localización transmembranal, que actúa como molécula de señalización con acción

paracrina (Perez et al. 1990), y la otra forma como citoquina soluble (MacEwan 2002). La forma soluble se deriva de la escisión proteolítica de la forma transmembranal (Kriegler et al. 1988). Las actividades de las dos formas de TNF α están mediadas a través de dos receptores diferentes: TNF α R1 (p55) y TNF α R2 (p75). Mientras que la forma transmembrana de TNF α activa tanto los receptores TNF α R1 y TNF α R2, la soluble funciona principalmente a través de la unión a TNF α R1 (Grell et al. 1995; Cabal-Hierro and Lazo 2012). La forma soluble de TNF α puede inducir una actividad proinflamatoria o un efecto citotóxico, induciendo la muerte celular a través de dos vías de señalización mediadas por el receptor TNF α R1 (MacEwan 2002; Tracey et al. 2008). Sin embargo, el TNF α puede tener las dos funciones neurotóxica o neuroprotectora, en función de su concentración (Chertoff et al. 2011). Este efecto dual se ha relacionado con la activación de distintos receptores (Fischer et al. 2011). En el tejido neural se ha descrito que el TNF α puede ser producido por la microglía, astrocitos, neuronas y células inmunes infiltradas (Hofman et al. 1989; Medana, Hunt, and Chaudhri 1997; McCoy and Tansey 2008; Rossi and Volterra 2009; Deng et al. 2010; Mei-Jen Wang et al. 2010; Park and Bowers 2010; Rathnasamy, Ling, and Kaur 2011), donde origina una activación de los astrocitos y la microglía (Selmaj et al. 1990; Tzeng et al. 1999). Se considera que el TNF α desempeña un papel crítico en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas (Bradley 2008; Horiuchi et al. 2010), incluyendo la esclerosis múltiple (Hofman et al. 1989; Mc Guire, Beyaert, and van Loo 2011; Ghosh 2012), la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Fillit et al. 1991; Morales, Farías, and Maccioni 2010; Montgomery and Bowers 2012).

En el ratón *hyh* con hidrocefalia congénita, estudios recientes de nuestro grupo, encontraron que existen unos niveles significativamente mayores de ARNm para TNF α en las formas severas de la enfermedad, en comparación con los ratones controles y, curiosamente, incluso en comparación con los ratones *hyh* que presenta una forma compensada de la enfermedad (Jiménez et al. 2014). La observación de una macrocefalia más pronunciada en los ratones *hyh* de 30 días de edad (hidrocefalia grave) que en los pocos animales que son capaces de alcanzar los 90 días (hidrocefalia compensada), sugiere que la presión intraventricular puede ser mayor en ratones con 30 días o durante el desarrollo, y que la presión podría inducir una deformidad craneal más pronunciada (Jiménez et al. 2014).

En esos mismos ratones *hyh*, las observaciones cualitativas obtenidas utilizando inmunohistoquímica con anticuerpos anti-TNF α en el pánquima cerebral, corroboran los datos sobre la expresión de ARNm (Jiménez et al. 2014). En ese estudio se ha puesto de manifiesto que existen dos formas de de inmunomarcaje de TNF α : la reactividad ~~en~~ las individuales, incluyendo astrocitos reactivos que sustituyen al epéndimo ausente en la mayoría de las superficies ventriculares; y un patrón difuso de reactividad ampliamente distribuido en todo el tejido cerebral. Esta última forma de inmunorreactividad sugiere la existencia de una forma soluble de TNF α con un efecto extenso (Jiménez et al. 2014). En las muestras humanas estudiadas, la preservación del tejido no permite observar ese tipo de patrón.

En la hidrocefalia feto-neonatal pueden estar presentes tanto fenómenos inflamatorios como isquémicos. En el neocórtex y en el hipocampo de modelos animales con hidrocefalia, se ha descrito la existencia de respuestas inflamatorias (Balasubramaniam and

Del Bigio 2002; Xu et al. 2012) y neurodegenerativas, incluyendo reacciones gliales (Deren et al. 2010; Xu et al. 2012), muerte neuronal y alteraciones metabólicas (Del Bigio and Bruni 1991; Ding et al. 2001a; Del Bigio, Ding et al. 2001b; Egawa et al. 2002; Klinge et al. 2002; Kawamata et al. 2003; Shim et al. 2003; Wilson, and Enno 2003; Kondziella et al. 2009), condiciones de hipoxia (Socci et al. 1999; Dombrowski et al. 2008;) y estrés oxidativo (Socci et al. 1999). Estas respuestas también se han descrito en la hidrocefalia feto-neonatal humana (Sival et al. 2008; Castejón 2010). Tanto la astrogliosis como la microgliosis, que pueden implicarse en los fenómenos inflamatorios, aparecen en sus formas reactivas en modelos animales con hidrocefalia y en la hidrocefalia humana congénita (Mangano et al. 1998; McAllister et al. 1998; Khan, Enno, and Del Bigio 2006; Páez et al. 2007; Deren et al. 2010; McAllister and Miller 2010; Roales-Buján et al. 2012). La presencia en el LCR de casos humanos con hidrocefalia feto-neonatal, de interleucina 8 (IL8) y de interferón gamma (IFN γ), es indicadora de la existencia de reacciones inflamatorias (Sival et al. 2008). En la hidrocefalia poshemorrágica también se han observado fenómenos inflamatorios, gliosis y daño en la sustancia blanca periventricular (Fukumizu, Takashima, and Becker 1996).

La expresión de TNF α inducida tras daños isquémicos en el tejido cerebral, incluyendo el hipocampo, se ha correlacionado con la muerte celular (Botchkina et al. 1997; Maddahi et al. 2011; Watters and O'Connor 2011). En las ratas con hidrocefalia inducida con caolina, se ha descrito la existencia de isquemia en la corteza cerebral, incluyendo el hipocampo (Del Bigio 2000; Klinge et al. 2003). Las condiciones isquémicas probablemente también están presentes en el hipocampo de los ratones *hyh* debido a una alta presión intraventricular, lo que podría inducir el aumento de la expresión de TNF α (Jiménez et al. 2014).

En los ratones *hyh* hidrocefálicos, existe una importante reacción astrocitaria periventricular que sustituye a la pérdida de epitelio del epéndimo en la mayor parte del sistema ventricular (Páez et al. 2007; Jiménez et al. 2009; Roales-Buján et al. 2012). Se ha encontrado que los astrocitos en esas regiones expresan tanto TNF α como su receptor TNF α R1 (Jiménez et al. 2014). Se ha demostrado que los astrocitos son capaces de producir TNF α *in vitro* para inducir la producción autocrina de factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF) (Kuno et al. 2006). Se ha encontrado que la lesión o isquemia en el SNC de ratas puede conducir al aumento de la expresión del receptor p75 (TNFR2) de NGF en los astrocitos, que probablemente controla la proliferación de astrocitos y, por lo tanto, restringe la correcta respuesta de los astrocitos (Oderfeld-Nowak et al. 2003; Cragolini et al. 2012). En experimentos *in vitro* se ha demostrado la estimulación y regulación de NGF por TNF α (Selmaj et al. 1990; Faber-Elman et al. 1995; Ait-Ikhlef et al. 1999; Cui et al. 2011). Un defecto en la producción de GDNF por los astrocitos podría mediar en la muerte de las células neuronales en condiciones isquémicas (Yamagata et al. 2002; Yamagata 2012). Como otro posible efecto, la producción de TNF α en los astrocitos podría mediar en la permeabilidad del endotelio de la barrera hemato-encefálica. De hecho, el TNF α ha sido implicado en la apertura de las uniones estrechas epiteliales bajo diferentes condiciones patológicas e inflamatorias (Didier et al. 2003; Minagar and Alexander 2003; Ye, Ma, and Ma 2006; Kimura et al. 2008; Landoni et al. 2012; Shen 2012). La presencia del receptor TNF α R2 se ha descrito en las células endoteliales (Maddahi et al. 2011), en el que podría desempeñar un

papel en la regulación de la permeabilidad vascular. Se ha descrito la presencia de TNF α y su receptor TNF α R1 en los pies perivasculares de los astrocitos reactivos y en las meninges de los ratones *hyh*, sugiriendo que el TNF α podría realizar algunas funciones todavía no bien conocidas, incluyendo un papel en la permeabilidad vascular o un efecto en la barrera hematoencefálica.

En el presente estudio de necropsias de fetos humanos con diferentes formas de hidrocefalia primaria, la presencia del factor TNF α se ha detectado en los astrocitos reactivos periventriculares y en las células microgliales. Por lo tanto, podría ser que el TNF α también se asocie en humanos con la hidrocefalia primaria a través de la reacción glial. En contraste a lo descrito en los ratones *hyh*, el número de astrocitos que expresan TNF α parecía ser bajo en los casos humanos. Esto podría ser debido a la dificultad para lograr una fijación satisfactoria del tejido humano.

La microglía reactiva constituye una población celular involucrada en los procesos neurodegenerativos e inflamatorios y en la producción de TNF. En los casos humanos de hidrocefalia primaria, en el presente estudio, se ha encontrado que la microglía contiene la citoquina. No obstante, la microglía no ha sido detectada con morfología activada, a pesar de encontrarse acumulada sobre todo en regiones que estaban denudadas de epéndimo. La morfología que hemos encontrado en los fetos hidrocefálicos era parecida a la descrita en los ratones *hyh* hidrocefálicos de 30 días de edad (Jiménez et al. 2014). Se ha descrito que la rata H-Tx con hidrocefalia congénita exhibe una respuesta microglial que varía con la edad y la gravedad de la hidrocefalia (Mangano et al. 1998), y parece estar asociada con presiones más altas en el LCR (Miller and McAllister 2007). En el caso del ratón *hyh*, la presencia de microglía en estado activado ameboides sólo ha sido descrita en la sustancia blanca neocortical durante la primera semana de vida (Páez et al. 2007; Jiménez et al. 2014), que es un período de tiempo durante el cual la sustancia blanca periventricular muestra la degeneración masiva de mielina (Páez et al. 2007). Estas células no pudieron ser detectadas más tarde en ese modelo animal (Páez et al. 2007; Jiménez et al. 2014). Los resultados concernientes a la morfología microglial y la expresión de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) indican que la microglia probablemente no se activa en el ratón *hyh* maduro (Jiménez et al. 2014). No obstante, en el ratón *hyh* se ha detectado que algunas células de la microglía expresan niveles más altos de Iba-1 (una proteína de unión a calcio específica de microglía activada con actividad macrófaga) involucrada en el fruncido dependiente de Rac GTPasa de la membrana plasmática, relacionada con el plegamiento de la membrana y la fagocitosis (Ohsawa et al. 2000). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la microglía podría estar sutilmente activada en los ratones *hyh* maduros. No se puede destacar que en los casos humanos estudiados muestre también un tipo de activación sutil, o que el papel de la microglía en cuanto a la producción de TNF α sea distinto al del modelo animal.

6.9 Papel de la alteración de las moléculas de adhesión en la hidrocefalia

En el estado actual de los conocimientos sobre la hidrocefalia, se entiende que no sólo comprende un trastorno de la dinámica del LCR, sino también una alteración del parénquima nervioso. También se admite que las derivaciones quirúrgicas del LCR no resuelven la mayoría de los aspectos de la enfermedad (Jones and Klinge 2008). De hecho, el 80-90 % del deterioro neurológico de los recién nacidos que desarrollan hidrocefalia, no es revocado por la cirugía derivativa.

Existen evidencias de una asociación de la hidrocefalia congénita con trastornos del desarrollo cerebral que comienzan temprano en la vida embrionaria, acompañados de una interrupción de la zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV). Sin embargo, la naturaleza, los mecanismos y la extensión del daño cerebral que estaría vinculado a la hidrocefalia están lejos de ser plenamente conocidos. Del Bigio (Del Bigio 2001) y Williams (Williams et al. 2007) plantean que un mejor tratamiento de la hidrocefalia y una mejoría del deterioro neurológico asociado, vendrá de una mejor comprensión de la base biológica del SNC y de conocer mejor las anomalías que se producen en la hidrocefalia (Jones and Klinge 2008).

Prácticamente todas las células del SNC de los mamíferos en desarrollo son producidas en dos zonas germinales que forman las paredes ventriculares, la ZV y la ZSV (Jacobson 1991; Brazel et al. 2003; Götz and Huttner 2005; Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Malatesta, Appolloni, and Calzolari 2008). La ZV, durante el desarrollo, consiste en un neuroepitelio pseudoestratificado que contiene glía radial. Las células madre neurales presentes en el neuroepitelio se alinean en la superficie ventricular y presentan un proceso basal largo que llega a la superficie pial. Un punto de referencia de las células madre neurales es su cilio único que se proyecta hacia el ventrículo y se baña en el LCR (Mori, Buffo, and Götz 2005; Kazanis et al. 2008). En el desarrollo, la glía radial origina finalmente un epéndimo. En el ser humano, la diferenciación de las células endimarias comienza aproximadamente en la cuarta semana de gestación y se completa alrededor de la 22SG (Sarnat 1992b). La ZSV se encuentra debajo de la ZV a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos laterales del SNC embrionario; contiene los precursores neurales, que pierden el contacto con la superficie ventricular, proliferan extensivamente y luego se diferencian en neuroblastos migratorias (Brazel et al. 2003; Bonfanti and Peretto 2007). Con los años, sobre la base de las investigaciones de nuestro grupo y las de otros, hemos llegado progresivamente a la opinión de que una interrupción de la ZV y ZSV, en la mayoría de los casos debido a defectos genéticos, provoca la aparición de la hidrocefalia congénita y en consecuencia una neurogénesis anormal.

6.9.1 Mecanismos implicados en la interrupción de la zona ventricular

En los casos de hidrocefalia congénita estudiados en la presente Tesis Doctoral, se han encontrado anomalías en la expresión de las moléculas de adhesión del tipo cadherinas y en las que forman las uniones de acoplamiento del tipo *gap*. Este tipo de evidencias también han sido encontradas en casos de hidrocefalia congénita con mielomeningocele (Sival et al. 2011; Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015).

Las células que forman la ZV/epéndimo de fetos humanos, están unidas por N-cadherina formando uniones adherentes y además uniones comunicantes (Guerra et al. 2010; Sival et al. 2011). En los pacientes hidrocefálicos estudiados en la presente Tesis Doctoral, al igual que se ha evidenciado en otros estudios en casos humanos y en modelos animales, las zonas con epéndimo próximo a desprenderse presentan una expresión anormal de N-cadherina (Sival et al. 2011; Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). En nuestro estudio y en los mencionados, cuando se observan estas células cercanas a las regiones afectadas sin epéndimo, se observa que la distribución de las proteínas de unión en el citoplasma de las células de la ZV podría reflejar anomalías en su transporte a la membrana plasmática o, menos probable, en su internalización y degradación (Laird 2006).

La interrupción de la capa endimaria en la ZV, en modelos animales con hidrocefalia, tiene un programa con patrones temporales y espaciales, que avanza a lo largo del sistema ventricular dejando atrás unos cambios celulares importantes (Jiménez et al. 2001; Rodríguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). Los estudios en los distintos modelos animales tienen en común que la afectación de la ZV o del epéndimo tiene lugar en determinados momentos de su desarrollo donde pueden implicarse mecanismos de adhesión celular.

Las moléculas de adhesión del tipo cadherinas desempeñan un papel clave durante la formación del tubo neural (Ivanov, Philippova, and Tkachuk 2001), y representan la principal molécula de adhesión calcio-dependiente en la ZV y más tarde en el epéndimo (Hatta et al. 1987; Chenn et al. 1998). Cuando se inyectan anticuerpos contra la N-cadherina en el LCR de embriones de pollo, secundariamente se produce la pérdida del epéndimo de la ZV y se induce la formación de rosetas endimarias periventriculares (Gänzler-Odenthal and Redies 1998). En el ratón *hyh* existe una mutación de los genes que codifican la proteína α SNAP (Chae et al. 2004), una proteína clave en el tráfico intracelular de vesículas membranosas. Esta mutación resulta en el transporte anormal de E-cadherina a la membrana plasmática de células madre neurales (Chae et al. 2004). Estos ratones sufren una masiva pérdida celular en la ZV. La pérdida del epéndimo de la ZV que se produce en diversos modelos de ratones se puede explicar en función a que la formación de uniones adherentes se ha deteriorado por la eliminación de moléculas reguladoras tales como la proteína Lgl1 (Klezovitch et al. 2004), la isoforma lambda de la proteína quinasa C atípica (α PKC λ) (Imai et al. 2006), y la proteína miosina IIB no muscular (NMIIB) (Ma, Bao, and Adelstein 2007). En distintos modelos animales se puede asociar la aparición de hidrocefalia y la translocación anormal de células en el ventrículo con un defecto en las uniones célula-célula que resultan en una pérdida del epéndimo en la ZV (Kamiguchi, Hlavin, and Lemmon 1998; Tullio et al. 2001; Bátiz et al. 2009).

Las uniones de acoplamiento tipo *gap* son consideradas no sólo como canales entre las células vecinas, sino también como complejos de señalización que regulan y sincronizan la función celular (Saez et al. 2003; Dbouk et al. 2009). Las conexinas que constituyen tales uniones también forman hemicanales funcionales que proporcionan una vía que une el medio intra y extracelular (Sáez et al. 2005; Dbouk et al. 2009; Orellana et al. 2009). Las uniones *gap* desempeñan un papel importante en el acoplamiento célula-célula para mantener sincronizados el movimiento ciliar de las células ependimarias (Goodenough, Goliger, and Paul 1996; Perez Velazquez and Carlen 2000; Rouach et al. 2002) y el flujo del LCR (Banizs et al. 2005). Algunos estudios indican que la formación de uniones *gap* y las uniones adherentes son fenómenos relacionados (Jongen et al. 1991; Meyer et al. 1992; Fujimoto et al. 1997; Wei et al. 2005; Oka et al. 2006; Laird 2006; Derangeon et al. 2010).

Además se ha demostrado que los mecanismos no genéticos también pueden conducir a la pérdida del epéndimo en la ZV, y en concreto en las formas de hidrocefalia poshemorrágicas. El ácido lisofosfatídico es un factor sanguíneo que se encuentra en hemorragias intracraneales. Este factor se une a unos receptores expresados por las células de la ZV y desencadena la pérdida del epéndimo posiblemente afectándose su adhesión celular, y consecuentemente hidrocefalia (Yung et al. 2011).

En resumen, la alteración de la ZV puede estar directa o indirecta debida a problemas en el establecimiento de uniones adherentes y uniones comunicantes (Chae et al. 2004; Klezovitch et al. 2004; Bátiz et al. 2006; Imai et al. 2006; Ma, Bao, and Adelstein 2007; Rasin et al. 2007; Nechiporuk, Fernandez, and Vasioukhin 2007; Ferland et al. 2009; Sival et al. 2011).

6.9.2 La interrupción de la zona ventricular del acueducto

A lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos han servido para comparar, en la medida de lo posible, los obtenidos en humanos con los que presenta el ratón mutante *hyh*, modelo ampliamente estudiado de hidrocefalia feto-neonatal que también se utiliza intensivamente en nuestro grupo de investigación. Las características fenotípicas del ratón *hyh*, tales como el tiempo de inicio de la hidrocefalia, el tipo de dinámica anormal del LCR, la evolución clínica, y la supervivencia/tasa de mortalidad (Jiménez et al. 2001; Wagner et al. 2003; Bátiz et al. 2006; Páez et al. 2007), son similares a los encontrados en la hidrocefalia congénita humana, y lo convierten en un modelo animal adecuado.

El ratón *hyh* presenta una pérdida de epéndimo programada en la ZV. La pérdida del epitelio de la pared ventral del acueducto de Silvio comienza en etapas tempranas de la vida fetal (E12.5) y precede a la aparición de una moderada hidrocefalia comunicante. La pérdida del epéndimo de la pared dorsal del acueducto de Silvio ocurre poco después del nacimiento, y conduce a la fusión de las paredes desnudas ventral y dorsal del acueducto de Silvio, dando como resultado la obliteración del acueducto y una hidrocefalia grave (Jiménez et al. 2001; Wagner et al. 2003; Páez et al. 2007). La pérdida del epéndimo de la ZV que se asocia con el inicio de la hidrocefalia también ha sido encontrada en ratones mutantes por otros grupos de

investigación (Klezovitch et al. 2004; Imai et al. 2006; Ma, Bao, and Adelstein 2007; Rasin et al. 2007; Nechiporuk, Fernandez, and Vasioukhin 2007).

En los fetos hidrocefálicos humanos que hemos investigado y que se presentan, al igual que en otros casos estudiados de hidrocefalia por mielomeningocele (Sival et al. 2011), se ha encontrado que la pérdida del epéndimo en la ZV puede preceder, y probablemente desencadenar la aparición de hidrocefalia (Dominguez-Pinos et al. 2005; Guerra et al. 2015). Se puede postular, por las razones de peso explicadas en los diferentes apartados de la presente Tesis Doctoral, que una alteración principal de la ZV debida a diversos defectos genéticos puede desencadenar la aparición de hidrocefalia congénita. Puede tener lugar a través de dos mecanismos (Perez-Figares, Jimenez, and Rodríguez 2001; Wagner et al. 2003; Sival et al. 2011; Jiménez et al. 2014):

- En primer lugar, la expresión anormal de conexina-43 y la pérdida del epéndimo en el acueducto de Silvio. Esto implica la función anormal o la ausencia de células multiciliadas; y, en consecuencia, el flujo de LCR a través del acueducto estaría reducido.
- Más tarde, la pérdida completa de epéndimo (periodo perinatal) conduce a la fusión de las ZSV desnudas conduciendo a una estenosis/obliteración del acueducto de Silvio.

Estas alteraciones de forma conjunta contribuyen a la aparición de una hidrocefalia grave.

6.10 Alteraciones de la neurogénesis en la hidrocefalia

La alteración de la ZV en los fetos humanos hidrocefálicos puede explicar que se afecte el proceso de neurogénesis postnatal.

La mayoría de las células del SNC de los mamíferos se produce durante el desarrollo en dos zonas germinales asociadas con las paredes ventriculares, la ZV y la ZSV. La ZV está formada por epéndimo de aspecto pseudoestratificado que contiene células madre neurales pluripotentes. A medida que se desarrolla el SNC, esta zona se transforma progresivamente en epéndimo inmaduro que luego termina de diferenciarse. La ZSV se encuentra debajo de la ZV a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos laterales del cerebro embrionario (Wichterle et al. 1999). La neurogénesis continúa en esta zona durante toda la vida de los animales (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002). En roedores y primates, la zona subventricular postnatal de animales maduros contiene progenitores primarios (células madre) y secundarios (neuroblastos); y neuronas jóvenes nacidas en esta región que migran en cadenas para reemplazar las neuronas del bulbo olfatorio (Kornack and Rakic 2001; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002). En el humano adulto, sin embargo, la ZSV es un nicho de organización

única, donde los astrocitos que forman grupos subependimarios se comportan como células progenitoras pluripotentes y los neuroblastos no migran (Sanai et al. 2004). Según estos hallazgos, la ZSV de los fetos humanos de mayor edad gestacional estudiados (36 y 40 semanas) es una zona claramente identificada, ocupada por astrocitos y neuroblastos, que se asemeja a la descrita en roedores (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002) y primates (Kornack and Rakic 2001). Aunque se necesitan más evidencias para confirmar la presencia en el SNC fetal humano de una ZSV “convencional”, se plantea la cuestión de cómo y cuándo se produce el cambio de la ZSV fetal convencional a la ZSV posnatal única.

En un estudio en el ratón hidrocefálico *hyh* (Jimenez et al. 2009), se ha descrito que la pérdida del epéndimo de los ventrículos laterales de los fetos hidrocefálicos adultos resulta en (i) la pérdida de las células madre de la ZSV, (ii) la desorganización de la ZSV, y (iii) la migración anormal de neuroblastos en la cavidad ventricular.

6.10.1 Relación de la alteración en la ZV con defectos en el desarrollo cortical

La pérdida del epitelio ventricular de la ZV después del nacimiento lleva a la pérdida de células endoteliales maduras. Sin embargo, tal y como se ha comentado que el proceso en modelos animales como el ratón *hyh* y la rata H-Tx, la interrupción de la ZV tiene lugar también en momentos del desarrollo cortical. El desarrollo anormal de ciertas estructuras cerebrales puede traducirse en un deterioro neurológico específico.

En el caso de los ratones *hyh* la alteración en el desarrollo de su ZV, que contiene las células madre, provoca que en la ZSV exista una sobreproducción temprana de neuronas a expensas de células progenitoras. Esto explicaría la pérdida progresiva de las células progenitoras en los mutantes *hyh* de E12.5. La pérdida de las células de la glía radial y de las células madre neurales formadas, también contribuye a que exista un número reducido de progenitores en la ZSV. No hay estudios sobre la actividad proliferativa de los precursores neuronales de la ZSV de los fetos humanos con alteración de la ZV. La pérdida generalizada y la desorganización del epéndimo constituye un fenómeno que también se encuentra en el SNC de los niños con lisencefalia y otros trastornos de la migración de neuroblastos (Sarnat et al. 1993). Se puede sugerir que la pérdida del epéndimo de la ZV encontrada en los fetos hidrocefálicos no sólo estaría asociada con la patogénesis de la hidrocefalia, sino también con una neurogénesis anómala.

En los casos estudiados en la presente Tesis Doctoral, hemos encontrado que en relación con la pérdida extensa del epéndimo en los ventrículos laterales existe un desplazamiento de progenitores neurales en el ventrículo, su localización anómala alrededor de los vasos sanguíneos, así como la formación de heterotopías periventriculares.

El deterioro de la migración neuronal durante el desarrollo da lugar a varias malformaciones de la corteza cerebral de origen genético: lisencefalia (cerebro liso), heterotopía subcortical (corteza cerebral normal con grupos de neuronas heterotópicas) y

heterotopía periventricular (Barkovich, Koch, and Carrol 1991; Ricci et al. 1992; Kamuro and Tenokuchi 1993; Dobyns et al. 1996; Ferland et al. 2009). Las heterotopías ventriculares son racimos de neuroblastos/neuronas ectópicas posicionados a lo largo de los ventrículos laterales (Ferland et al. 2009). Los casos humanos que presentan pérdida del epéndimo de la ZV del telencéfalo también presentan grupos de heterotopias ventriculares compuestas principalmente por neuronas tardías (Ferland et al. 2009). Las mutaciones en cualquiera de los dos genes humanos que codifican la filamina A (FLNA) o factor 2 de intercambio de nucleotido guanina de ribosilación del ADP (ARFGEF2), causan heterotopías periventriculares (Sheen et al. 2001; Sheen et al. 2004). En ratón, la pérdida de la función FLNA afecta a la adhesión de las células de la ZV, induce la pérdida del epéndimo y deterioros en la migración neuronal (Ferland et al. 2009). En el ratón *hyh* también se observa que la pérdida del epéndimo de la ZV conduce a la formación de heterotopías periventriculares (Ferland et al. 2009). Estos hallazgos inducen a pensar que la presencia de heterotopias periventriculares resulta de las alteraciones en la ZV, que pueden derivar de las alteraciones del transporte vesicular y de las moléculas de adhesión en sus células (Ferland et al. 2009). La pérdida de la ZV puede implicar a la glía radial. Por lo tanto, se esperaría que la migración neuronal esté deteriorada en los sitios que posteriormente carezcan de epéndimo, y por ello se formen heterotopias periventriculares (Ferland et al. 2009; Rodriguez et al. 2012; Guerra et al. 2015). Sin embargo, poco se sabe sobre la influencia de la pérdida del epéndimo de la ZV en la corticogénesis.

En conclusión, es probable que una alteración en el desarrollo de la ZV de los casos estudiados en la presente Tesis Doctoral pueda explicar la localización y migración anormal de los neuroblastos, y por tanto el origen de algunas consecuencias clínicas cognitivas en pacientes con hidrocefalia.

6.11 Traslación de los resultados histopatológicos a otros tipos de análisis

En la presente Tesis Doctoral se ha podido contar con un número suficiente de necropsias de fetos con diversas formas de hidrocefalia, a pesar de la escasa incidencia de la enfermedad y disponibilidad de este tipo de muestras. No obstante, han sido suficientes para obtener avances sustanciales en el conocimiento de la etiología de la hidrocefalia fetoneonatal. Ha sido una aspiración lógica en la última parte de la Tesis Doctoral, explorar la posibilidad de encontrar otros tipos de análisis más accesibles que sustenten los hallazgos y ayuden en el conocimiento futuro.

Como se ha mostrado en los resultados, uno de los casos presentados en esta Tesis Doctoral ha podido ser estudiado con pruebas de imagen e histológicamente. Se trataba de un caso de hidrocefalia muy leve en el estudio de imagen, de características comunicantes, donde solo se observaba una dilatación leve de un ventrículo lateral. No obstante, ha sido

sorprendente encontrar que presenta los mismos hallazgos histopatológicos que el resto de los casos estudiados, con pérdida de epéndimo en la superficie ventricular. En el estudio de las moléculas de adhesión muestran hallazgos similares en las zonas próximas a las que han perdido el epéndimo, indicando que podrían afectarse en el futuro. Ha sido un hallazgo significativo encontrar que pequeñas dilataciones del sistema ventricular ya tengan aparejada la pérdida endimaria, lo que apoya el hecho de que la pérdida de epéndimo precede a la dilatación del ventrículo y a los procesos obstructivos como hemos explicado en apartados previos.

Los estudios de espectroscopía de LCR que proporcionan una información metabolómica son poco conocidos, y actualmente existen pocas publicaciones al respecto y ninguna sobre su utilidad en pacientes con hidrocefalia. Los estudios de metabolómica existentes se han utilizado para encontrar marcadores de enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica (Blasco et al. 2010), enfermedades de la motoneurona (Blasco et al. 2014), esclerosis múltiple (Reinke et al. 2014), Parkinson (Trupp et al. 2014) y Alzheimer (Lista et al. 2014). Aun así, constituyen un campo prometedor para el diagnóstico de enfermedades neurológicas (Zhang, Sun, and Wang 2013).

Hemos llevado a cabo un estudio empleando muestras de LCR de casos de hidrocefalia congénita de diferentes tipos, en distintos momentos evolutivos del mismo paciente donde era necesaria la extracción de LCR, que se relacionaba generalmente con complicaciones de las derivaciones. El objetivo ha sido conocer si la información que puede proporcionar una metodología como HR-MAS analizando la presencia de metabolitos en el LCR sirve para: a) apoyar las evidencias histopatológicas; y b) servir en el futuro para dar información útil que mejore la terapia y el seguimiento. Actualmente en el seguimiento existe dificultad sobre la elección del mejor momento para colocar una derivación ventriculoperitoneal y cuándo recambiarla.

Además se han recopilado los datos de la historia clínica en 4 pacientes con su archivo de imagen del SNC correspondiente, para tratar de encontrar una correlación entre las lesiones y la evolución clínica del paciente y los resultados de la metabolómica del LCR.

Una de las limitaciones más importantes de este estudio es que no ha sido posible hacer coincidir, por cuestiones éticas, la realización de pruebas de imagen con la obtención del LCR. Por lo tanto tenemos pruebas de imagen que nos indican cómo ha evolucionado el cerebro y resultados de LCR que no coinciden en el tiempo.

Los resultados mostraron un aumento de los niveles de lactato en los casos de hidrocefalia obstructiva (estenosis de acueducto de Silvio), que no se correlacionó con el tamaño del sistema ventricular, de forma que en el caso 1 donde la dilatación ventricular es significativa, presenta niveles de lactato similares al caso 2 con una dilatación más leve en imagen. En el primer caso nos parece significativa la bajada de los niveles de lactato a los 5 meses de edad. Correlacionándolo con los datos clínicos a los 4 meses ingresa por disfunción valvular, mostrando en las pruebas de imagen edema transpendimario y en la metabolómica un pico muy alto de lactato, que podría relacionarse con isquemia cerebral por aumento de la

presión intracraneal. A los cinco meses no hay nuevas referencias en la historia y el lactato baja en LCR que podría hacer pensar en descenso de la presión intracraneal. A los 8 meses se presenta una nueva complicación, esta vez infecciosa y también aumento de los niveles de lactato, no disponemos de imagen en ese momento de la evolución de la paciente.

En el caso 2 el lactato se mantuvo elevado en todo momento en relación con la complicación presentada (el sobredrenaje valvular); en imagen observamos un sistema ventricular colapsado.

En el caso 3 los niveles de lactato se mantuvieron altos a los 2 y 3 meses de vida, pero no es posible correlacionarlos con los hallazgos de la historia clínica ni con las pruebas de imagen. Pensamos que tiene relación con complicaciones valvulares, posiblemente obstrucción o infección.

En el caso 4 los niveles de lactato están más altos en el primer mes de vida que en ningún caso anterior, superando las 50 ppm; posteriormente, a los dos meses descienden. Este caso en lo evolutivo ha presentado un mal pronóstico y múltiples complicaciones (epilepsia, ceguera, etc.). Nuestra interpretación es que una presión intracraneal tan severa como para inducir este metabolismo anaerobio y este ascenso en el pico de lactato en edades tan precoces, tiene un efecto devastador en el desarrollo del parénquima cerebral, posteriormente los niveles solo pueden descender dado que queda poco parénquima cerebral vivo.

Por lo tanto se puede correlacionar los niveles de lactato con la disfunción valvular, bien obstructiva o bien infecciosa, y el aumento de las presiones intracraneales, de forma que podría ser un buen marcador evolutivo para ayudar a decidir al clínico cuando intervenir sobre la derivación. Y se podría plantear también como marcador pronóstico, ya que los casos con elevaciones inferiores a 25 ppm, en el primer año de vida, han tenido una mejor evolución clínica.

En todos los casos estudiados, además existe correlación entre los niveles de lactato y los de TNF α en LCR, de forma que podría ser un marcador evolutivo en los casos de complicación y aumento de presión intracraneal y posiblemente también pronóstico a largo plazo, si bien para el TNF α no hemos podido establecer un nivel a partir del cual mejore el pronóstico. Llama la atención los niveles tan bajos de TNF α del caso 4 que se asemeja mucho a los niveles encontrados en los controles. Pensamos que una hidrocefalia tan severa en un momento agudo debe presentar niveles más altos de TNF α , pero en la evolución de este caso, dado el escaso parénquima cerebral, se podría pensar que existe una disminución de la síntesis de TNF α o que en estadios muy precoces 1-2 meses de vida la vía del TNF α tiene una expresión estándar no modificada por los eventos vitales.

Los niveles de mioinositol se encuentran más elevados en los casos de hidrocefalia que en los controles, es significativo que aumente más en casos con edades más precoces (1-2 meses) y cuando se asocia espina bífida e hidrocefalia poshemorrágica. También están muy altos en casos de mayor edad (3-4 meses) con espina bífida y en menor medida en los casos de mayor edad (4-8 meses) con estenosis del acueducto de Silvio. Este aumento podría estar en

relación con la pérdida de epéndimo y la formación de la barrera astrogliar (dato que no hemos podido confirmar por estudio histológico). Este aumento es más significativo en los casos de hidrocefalia poshemorrágica (donde existe un ambiente proinflamatorio a nivel ventricular) y en la espina bífida (donde se han observado reacciones gliales más extensas) (Sival et al. 2008). Los niveles de mioinositol están aumentados por encima de los de lactato en los casos de espina bífida, salvo en el primer mes de la hidrocefalia poshemorrágica con espina bífida. En el estudio de imagen tenemos dos escenarios muy diferentes. Por un lado en el caso 3 observamos una dilatación del sistema ventricular leve, con estudios de imagen con una edad entre los 6 y los 7 años (donde no tenemos muestras de LCR). Por otro lado en el caso 4 observamos una dilatación severa y escaso parénquima cerebral, con muestras e imágenes desde el nacimiento. Esto dificulta la generación de hipótesis pero podría sugerir que el mioinositol en los casos de espina bífida podría ser un marcador mejor que el lactato y no tiene correlación con los niveles de TNF α .

Otro hallazgo que también se repite en todos los casos es la disminución de la glucosa, sin que exista correlación entre la presencia de infección y su disminución, ya que, como vemos en la historia clínica no todos los casos presentaban infección a esas edades. Por tanto deben existir otros fenómenos relacionados con el consumo de glucosa en el LCR. Una posibilidad es que tenga relación con el metabolismo a nivel parenquimatoso.

Los niveles de creatina se correlacionan con los de lactato, por lo que pensamos que es un reflejo de la isquemia que induce el metabolismo celular.

No queremos terminar sin hacer una reflexión a la ausencia de N-acetilaspártato en LCR. En la hipomielinización del SNC es posible detectar un aumento del N-acetilaspártato en LCR (Wolf et al. 2004). La hipomielinización severa forma parte de la enfermedad de Pelizaeus–Merzbacher (ausencia de mielinización del SNC, epilepsia intratable, *nistagmus*, microcefalia progresiva y retraso psicomotor severo), y también se ha descrito en la enfermedad de Canavan (trastorno del metabolismo de ácido aspártico, más frecuente en judíos asquenazís, cursa con retraso psicomotor). No se tiene una explicación clara para estos hallazgos, pero se piensa que el aumento de N-acetilaspártato en LCR puede tener que ver con un déficit enzimático que regula su destrucción. Otra explicación es que la ausencia de la mielina produzca una alteración en el metabolismo del N-acetilaspártato por lo que se libera de forma aumentada al LCR (Wolf et al. 2004). En nuestros casos de hidrocefalia no se detecta N-acetilaspártato en LCR, a pesar de que histológicamente vemos a las neuronas caer al LCR en los estudios histológicos. Una explicación posible es que los sistemas enzimáticos del LCR degradan el N-acetilaspártato por lo que no es detectable.

La colina es otro de los grandes ausentes en el LCR, pensamos que por motivos similares a los del N-acetilaspártato.

7. Conclusiones

Conclusiones

1. En las necropsias de los fetos con hidrocefalia congénita estudiados existen los siguientes eventos neuropatológicos comunes:
 - Ausencia de zonas del neuroepitelio o epéndimo, según edad gestacional, en la superficie de la zona ventricular.
 - Presencia de una reacción astrocitaria que cubre las regiones sin epéndimo.
 - Presencia anormal de progenitores neurales en la superficie ventricular, en contacto con el ventrículo, formando heterotopías periventriculares, o alrededor de vasos sanguíneos.
2. La existencia de un acueducto de Silvio abierto en los fetos estudiados, junto con las alteraciones en la zona ventricular, sugieren que estos casos que en principio tienen carácter de hidrocefalia no obstructiva, pueden evolucionar a obstructiva.
3. La disposición alterada de las moléculas de adhesión en las células de la zona ventricular, ya sea neuroepitelio o epéndimo, durante el desarrollo, sugiere que están implicadas en su denudamiento. Por tanto la ausencia de neuroepitelio/epéndimo puede explicarse en función a un defecto en el desarrollo de la zona ventricular, y no de la presencia de una alta presión intraventricular o ventriculomegalia.
4. La alteración del desarrollo de la zona ventricular cuando contiene glial radial y su desaparición, puede explicar la existencia de los defectos en la neurogénesis observados asociados a la hidrocefalia congénita, como la localización anormal de los progenitores neurales y la aparición de heterotopías periventriculares.
5. Los astrocitos reactivos, que sustituyen la ausencia de epéndimo, muestran características similares a los ependimocitos. Esto sugiere que representan un intento de reestablecer una nueva barrera en la interfase entre el líquido cefalorraquídeo y el parénquima nervioso.
6. Los astrocitos reactivos que aparecen en la superficie ventricular de los casos con hidrocefalia congénita, junto con la microglía, son una fuente de TNF α . Esta citoquina puede detectarse en niveles elevados en el LCR cuando existen complicaciones en los tratamientos derivativos. Puede ser indicador de condiciones neuroinflamatorias o de defectos en el drenaje del LCR. Existe una correlación entre los niveles de TNF α y de lactato.

8. Bibliografía

Bibliografía

1. Adams RD, Fisher CM, Hakim S, Ojemann RG, Sweet WH. Symptomatic occult hydrocephalus with «normal» cerebrospinal-fluid pressure. A treatable syndrome. *N Engl J Med.* 1965; 273: 117-26.
2. Aguas-Valiente J, Ferrer E. [Advantages of neuroendoscopy in the management of non-communicating hydrocephalus]. *Rev Neurol.* 1999; 29(3): 193-7.
3. Aït-Ikhlef A, Hantaz-Ambroise D, Jacque C, Belkadi L, Rieger F. Astrocyte proliferation induced by wobbler astrocyte conditioned medium is blocked by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1beta (IL-1beta) neutralizing antibodies in vitro. *Cell Mol Biol Noisy.* 1999; 45(4): 393-400.
4. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22(3): 629-34.
5. Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL. Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex.* 1999; 9(6): 646-54.
6. Anik I, Etus V, Anik Y, Ceylan S. Role of interpeduncular and prepontine cistern cerebrospinal fluid flow measurements in prediction of endoscopic third ventriculostomy success in pediatric triventricular hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg.* 2010; 46(5): 344-50.
7. Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One.* 2008; 3(6): e2388.
8. Bajjalieh S. Trafficking in cell fate. *Nat Genet.* 2004; 36(3): 216-7.
9. Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Analysis of age-dependant alteration in the brain gene expression profile following induction of hydrocephalus in rats. *Exp Neurol.* 2002; 173(1): 105-13.
10. Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development.* 2005; 132(23): 5329-39.
11. Barkovich AJ, Koch TK, Carrol CL. The spectrum of lissencephaly: report of ten patients analyzed by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol.* 1991; 30(2): 139-46.
12. Bátiz LF, Jiménez AJ, Guerra M, Rodríguez-Pérez LM, Toledo CD, Vio K, et al. New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol.* 2011; 121(6): 721-35.
13. Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, Rodríguez S, Wagner C, Pérez-Fígares JM, et al. Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the hyh mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis.* 2006; 23(1): 152-68.
14. Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Matas IM, Páez P, Roque M, et al. A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances

- the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes*. 2009; 23(6): 281-90.
15. Ben-Sira L, Garel C, Malinger G, Constantini S. Prenatal diagnosis of spinal dysraphism. *Childs Nerv Syst*. 2013; 29(9): 1541-52.
 16. Bermejo Sanchez E CI. Informe de vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España sobre los datos registrados por el ECEMC en el período 1980-2011. *Bol ECEMC Rev Dismor Epidemiol VI*. 2012; 2: 73-110.
 17. Bickers DS, Adams RD. Hereditary stenosis of the aqueduct of Sylvius as a cause of congenital hydrocephalus. *Brain J Neurol*. 1949; 72(Pt. 2): 246-62.
 18. Blackshear PJ, Graves JP, Stumpo DJ, Cobos I, Rubenstein JLR, Zeldin DC. Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development*. 2003; 130(19): 4539-52.
 19. Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, et al. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One*. 2010; 5(10): e13223.
 20. Blasco H, Nadal-Desbarats L, Pradat P-F, Gordon PH, Antar C, Veyrat-Durebex C, et al. Untargeted 1H-NMR metabolomics in CSF: toward a diagnostic biomarker for motor neuron disease. *Neurology*. 2014; 82(13):1 167-74.
 21. Bonfanti L, Peretto P. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol*. 2007; 83(1): 4-36.
 22. Botchkina GI, Meistrell ME, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med*. 1997; 3(11): 765-81.
 23. Bouillé C, Mesnil M, Barriere H, Gabrion J. Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia*. 1991; 4(1): 25-36.
 24. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res*. 1992; 94: 367-79.
 25. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008; 214(2): 149-60.
 26. Bravo C, Cano P, Conde R, Gelabert M, Pulido P, Ros B, et al. [Posthemorrhagic hydrocephalus in the preterm infant: current evidence in diagnosis and treatment]. *Neurocir*. 2011; 22(5): 381-99.
 27. Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol*. 2003; 69(1): 49-69.
 28. Brightman MW, Palay SL. The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *J Cell Biol*. 1963; 19: 415-39.
 29. Brightman MW. The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol*. 1965; 26(1): 99-123.
 30. Brightman MW. The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. *Am J Anat*. 1965; 117(2): 193-219.

31. Brightman MW. The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog Brain Res.* 1968; 29: 19-40.
32. Bruni JE, Del Bigio MR, Clattenburg RE. Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain Res.* 1985; 356(1): 1-19.
33. Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech.* 1998; 41(1): 2-13.
34. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9(2): 110-22.
35. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* 2012; 24(6): 1297-305.
36. Castejón OJ. Submicroscopic pathology of human and experimental hydrocephalic cerebral cortex. *Folia Neuropathol.* 2010; 48(3): 159-74.
37. Chae TH, Kim S, Marz KE, Hanson PI, Walsh CA. The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet.* 2004; 36(3): 264-70.
38. Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol Cell Neurosci.* 1998; 11(4): 183-93.
39. Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, et al. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor α in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol.* 2011; 227(2): 237-51.
40. Chikly B, Quaghebeur J. Reassessing cerebrospinal fluid (CSF) hydrodynamics: a literature review presenting a novel hypothesis for CSF physiology. *J Bodyw Mov Ther.* 2013; 17(3): 344-54.
41. Cinalli G, Maixner WJ, Sainte-Rose C. Pediatric hydrocephalus [Internet]. Milan; New York: Springer; 2005 [citado 21 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1007/978-88-470-2121-1>
42. Cinalli G, Sainte-Rose C, Chumas P, Zerah M, Brunelle F, Lot G, et al. Failure of third ventriculostomy in the treatment of aqueductal stenosis in children. *J Neurosurg.* 1999; 90(3): 448-54.
43. Coskun V, Wu H, Bianchi B, Tsao S, Kim K, Zhao J, et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(3): 1026-31.
44. Couture A, Veyrac C, Baud C, Saguinthaah M, Ferran JL. Advanced cranial ultrasound: transfontanelar Doppler imaging in neonates. *Eur Radiol.* 2001; 11(12): 2399-410.
45. Cragolini AB, Volosin M, Huang Y, Friedman WJ. Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Dev Neurobiol.* 2012; 72(6): 766-76.
46. Cui M, Huang Y, Tian C, Zhao Y, Zheng J. FOXO3a inhibits TNF- α - and IL-1 β -induced astrocyte proliferation: Implication for reactive astrogliosis. *Glia.* 2011; 59(4): 641-54.
47. Da Silva M. Pathophysiology of hydrocephalus. En: *Pediatric hydrocephalus.* Springer; 2005. p. 65-78.

48. Dan NG, Wade MJ. The incidence of epilepsy after ventricular shunting procedures. *J Neurosurg.* 1986; 65(1): 19-21.
49. Dandy WE. Extirpation of the choroid plexus of the lateral ventricles in communicating hydrocephalus. *Ann Surg.* 1918; 68(6): 569-79.
50. Dandy, W B KD. Internal hydrocephalus: an experimental, clinical and pathological study. *Am J Child.* 1914; 8: 406-82.
51. Davson H, Segal MB. *Physiology of the CSF and blood-brain barriers.* Boca Raton: CRC Press; 1996. 822 p.
52. Davy BE, Robinson ML. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(10): 1163-70.
53. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal.* 2009; 7: 4.
54. De Juan Romero C, Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia.* 2015; 63(8): 1303-19.
55. Del Bigio MR, Bruni JE. Silicone oil-induced hydrocephalus in the rabbit. *Childs Nerv Syst.* 1991; 7(2): 79-84.
56. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol.* 2003; 53(3): 337-46.
57. Del Bigio MR, Zhang YW. Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus. *Exp Neurol.* 1998; 154(1): 157-69.
58. Del Bigio MR. Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59(11): 946-54.
59. Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1): 55-73.
60. Del Bigio MR. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54(3): 405-6.
61. Del Bigio MR. Pathophysiologic consequences of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am.* 2001; 12(4): 639-49, vii.
62. Del Bigio MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia.* 1995; 14(1): 1-13.
63. del Brío MA, Riera P, Muñoz RI, Montecinos H, Rodríguez EM. The metencephalic floor plate of chick embryos expresses two secretory glycoproteins homologous with the two glycoproteins secreted by the subcommissural organ. *Histochem Cell Biol.* 2000; 113(6): 415-26.
64. del Brio MA, Riera P, Peruzzo B, Rodríguez EM. Hindbrain floor plate of the rat: ultrastructural changes occurring during development. *Microsc Res Tech.* 2001; 52(5): 615-26.
65. Deng YY, Lu J, Ling E-A, Kaur C. Microglia-derived macrophage colony stimulating factor promotes generation of proinflammatory cytokines by astrocytes in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain. *Brain Pathol Zurich Switz.* 2010; 20(5): 909-25.

66. Derangeon M, Bozon V, Defamie N, Peineau N, Bourmeyster N, Sarrouilhe D, et al. 5-HT4 and 5-HT2 receptors antagonistically influence gap junctional coupling between rat auricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48(1): 220-9.
67. Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW, et al. Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol.* 2010; 226(1): 110-9.
68. Desmond ME, Duzy MJ, Federici BD. Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *Dev Dyn.* 1993; 197(4): 291-306.
69. Di Rocco C, Massimi L, Tamburrini G. Shunts vs endoscopic third ventriculostomy in infants: are there different types and/or rates of complications? A review. *Childs Nerv Syst.* 2006; 22(12): 1573-89.
70. Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem.* 2003; 86(1): 246-54.
71. Ding Y, McAllister JP, Yao B, Yan N, Canady AI. Axonal damage associated with enlargement of ventricles during hydrocephalus: a silver impregnation study. *Neurol Res.* 2001; 23(6): 581-7.
72. Ding Y, McAllister JP, Yao B, Yan N, Canady AI. Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience.* 2001; 106(4): 659-67.
73. Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, et al. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology.* 1996; 47(2): 331-9.
74. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003; 6(11): 1127-34.
75. Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, Leichliter A, Leibson Z, Luciano MG. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus. *Neuroscience.* 2008; 152(2): 346-59.
76. Dominguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez A-J, Weil B, Arráez M-A, Pérez-Fígares J-M, et al. Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64(7): 595-604.
77. Dooling EC, Chi JG, Gilles FH. Ependymal changes in the human fetal brain. *Ann Neurol.* 1977; 1(6): 535-41.
78. Drake JM, Canadian Pediatric Neurosurgery Study Group. Endoscopic third ventriculostomy in pediatric patients: the Canadian experience. *Neurosurgery.* 2007; 60(5): 881-6.
79. Dziegielewska KM, Hinds LA, Møllgård K, Reynolds ML, Saunders NR. Blood-brain, blood-cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid-brain barriers in a marsupial (*Macropus eugenii*) during development. *J Physiol.* 1988; 403: 367-88.
80. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocyte implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993; 54(1): 15-36.
81. Egawa T, Mishima K, Egashira N, Fukuzawa M, Abe K, Yae T, et al. Impairment of spatial memory in kaolin-induced hydrocephalic rats is associated with changes in

- the hippocampal cholinergic and noradrenergic contents. *Behav Brain Res.* 2002; 129(1-2): 31-9.
82. Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. *Neurotoxicology.* 2012; 33(3): 586-604.
 83. Emery JL, Staschak MC. The size and form of the cerebral aqueduct in children. *Brain J Neurol.* 1972; 95(3): 591-8.
 84. Enriquez G, Correa F, Aso C, Carreño JC, Gonzalez R, Padilla NF, et al. Mastoid fontanelle approach for sonographic imaging of the neonatal brain. *Pediatr Radiol.* 2006; 36(6): 532-40.
 85. Faber-Elman A, Lavie V, Schwartz I, Shaltiel S, Schwartz M. Vitronectin overrides a negative effect of TNF-alpha on astrocyte migration. *FASEB J.* 1995; 9(15): 1605-13.
 86. Faggin R, Calderone M, Denaro L, Meneghini L, d'Avella D. Long-term operative failure of endoscopic third ventriculostomy in pediatric patients: the role of cine phase-contrast MR imaging. *Neurosurg Focus.* 2011; 30(4): E1.
 87. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196(2): 147.e1-8.
 88. Ferland RJ, Batiz LF, Neal J, Lian G, Bundock E, Lu J, et al. Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(3): 497-516.
 89. Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, et al. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci.* 2010; 13(6): 690-9.
 90. Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1991; 129(2): 318-20.
 91. Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27621.
 92. Fleischer AC. *Ecografía en obstetricia y ginecología.* Madrid: Marbán; 2009.
 93. Fong KW, Toi A, Salem S, Hornberger LK, Chitayat D, Keating SJ, et al. Detection of fetal structural abnormalities with US during early pregnancy. *Radiographics.* 2004; 24(1): 157-74.
 94. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(7): 1161-8.
 95. Fries G, Pernecky A. Intracranial endoscopy. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 1999; 25: 21-60.
 96. Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci.* 1997; 110 (Pt 3): 311-22.
 97. Fukumizu M, Takashima S, Becker LE. Glial reaction in periventricular areas of the brainstem in fetal and neonatal posthemorrhagic hydrocephalus and congenital hydrocephalus. *Brain Dev.* 1996; 18(1): 40-5.

98. Gabrion JB, Herbuté S, Bouillé C, Maurel D, Kuchler-Bopp S, Laabich A, et al. Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc Res Tech.* 1998; 41(2): 124-57.
99. Gänzler-Odenthal SI, Redies C. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci.* 1998; 18(14): 5415-25.
100. Garne E, Loane M, Addor M-C, Boyd PA, Barisic I, Dolk H. Congenital hydrocephalus--prevalence, prenatal diagnosis and outcome of pregnancy in four European regions. *Eur J Paediatr Neurol.* 2010; 14(2): 150-5.
101. Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev Biol.* 2009; 327(2): 263-72.
102. Ghosh S. Biologic therapies: lessons from multiple sclerosis. *Dig Dis.* 2012; 30(4): 383-6.
103. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7): 1324-35.
104. Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science.* 1985; 228(4698): 497-9.
105. Gómez-Roldán M, Pérez-Martín M, Capilla-González V, Cifuentes M, Pérez J, García-Verdugo JM, et al. Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J Comp Neurol.* 2008; 507(4): 1571-87.
106. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 475-502.
107. Gosens R, Mutawe M, Martin S, Basu S, Bos ST, Tran T, et al. Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med.* 2008; 8(8): 741-53.
108. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(10): 777-88.
109. Goumnerova LC, Frim DM. Treatment of hydrocephalus with third ventriculocisternostomy: outcome and CSF flow patterns. *Pediatr Neurosurg.* 1997; 27(3): 149-52.
110. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995; 83(5): 793-802.
111. Guerra M, Blázquez JL, Peruzzo B, Peláez B, Rodríguez S, Toranzo D, et al. Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(2): 359-81.
112. Guerra MM, Henzi R, Ortloff A, Lichtin N, Vío K, Jiménez AJ, et al. Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015; 74(7): 653-71.

113. Gutzman JH, Sive H. Epithelial relaxation mediated by the myosin phosphatase regulator Mypt1 is required for brain ventricle lumen expansion and hindbrain morphogenesis. *Development*. 2010; 137(5): 795-804.
114. Hakim S, Adams RD. The special clinical problem of symptomatic hydrocephalus with normal cerebrospinal fluid pressure. Observations on cerebrospinal fluid hydrodynamics. *J Neurol Sci*. 1965; 2(4): 307-27.
115. Halevy A, Cohen R, Viner I, Diamond G, Shuper A. Development of Infants With Idiopathic External Hydrocephalus. *J Child Neurol*. 2015; 30(8): 1044-7.
116. Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010; 464(7288): 554-61.
117. Harrison TR, Isselbacher KJ, Agud Aparicio JL. Harrison principios de medicina interna. Madrid: McGraw-Hill; 1998.
118. Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol*. 1987; 120(1): 215-27.
119. Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA. Astroglia in CNS injury. *Glia*. 1991; 4(2): 233-43.
120. Heep A, Bartmann P, Stoffel-Wagner B, Bos A, Hoving E, Brouwer O, et al. Cerebrospinal fluid obstruction and malabsorption in human neonatal hydrocephaly. *Childs Nerv Syst*. 2006; 22(10): 1249-55.
121. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 1989; 170(2): 607-12.
122. Hong H-K, Chakravarti A, Takahashi JS. The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(6): 1748-53.
123. Horcujadas Almansa Á, Cordero Tous N, Román Cutillas A, Jorques Infante A, Saura Rojas E, Iáñez Velasco B. [Usefulness of continuous intracranial pressure monitoring in long-standing overt ventriculomegaly in adults]. *Neurocir Astur*. 2015; 26(2): 64-72.
124. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010; 49(7): 1215-28.
125. Imai F, Hirai S, Akimoto K, Koyama H, Miyata T, Ogawa M, et al. Inactivation of aPKClambda results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development*. 2006; 133(9): 1735-44.
126. Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry*. 2001; 66(10): 1174-86.
127. Jacobson M. *Developmental neurobiology*. 3rd ed. New York: Plenum Press; 1991. 776 p.
128. Jäderstad J, Brismar H, Herlenius E. Hypoxic preconditioning increases gap-junctional graft and host communication. *Neuroreport*. 2010; 21(17): 1126-32.
129. Jarvis CR, Andrew RD. Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci*. 1988; 8(10): 3691-702.

130. Jiménez AJ, Domínguez-Pinos M-D, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares J-M. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2014; 2: e28426.
131. Jimenez AJ, García-Verdugo JM, González CA, Bátiz LF, Rodríguez-Pérez LM, Páez P, et al. Disruption of the Neurogenic Niche in the Subventricular Zone of Postnatal Hydrocephalic hyh Mice: *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68(9): 1006-20.
132. Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA, Bátiz LF, Rodríguez-Pérez LM, Páez P, et al. Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009; 68(9): 1006-20.
133. Jiménez A-J, Rodríguez-Pérez L-M, Domínguez-Pinos M-D, Gómez-Roldán M-C, García-Bonilla M, Ho-Plagaro A, et al. Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF α) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014; 40(7): 911-32.
134. Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez P, et al. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60(11): 1105-19.
135. Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008; 5: 10.
136. Johnston M, Papaiconomou C. Cerebrospinal fluid transport: a lymphatic perspective. *News Physiol Sci*. 2002; 17: 227-30.
137. Jones HC, Klinge PM. Hydrocephalus 2008, 17-20th September, Hannover Germany: a conference report. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008; 5: 19.
138. Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, et al. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol*. 1991; 114(3): 545-55.
139. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol*. 2010; 25(1): 99-112.
140. Kahle KT, Kulkarni AV, Limbrick DD, Warf BC. Hydrocephalus in children. *Lancet* 2015; S0140-6736.
141. Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci*. 1998; 12(1-2): 48-55.
142. Kamuro K, Tenokuchi Y. Familial periventricular nodular heterotopia. *Brain Dev*. 1993; 15(3): 237-41.
143. Kawamata T, Katayama Y, Tsuji N, Nishimoto H. Metabolic derangements in interstitial brain edema with preserved blood flow: selective vulnerability of the hippocampal CA3 region in rat hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl*. 2003; 86: 545-7.
144. Kazanis I, Lathia J, Moss L, French-Constant C. The neural stem cell microenvironment. En: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 [citado 2 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27023/>

145. Kettenmann H, Ransom BR, editores. Neuroglia. Third Edition. OUP USA; 2013. 864 p.
146. Khan OH, Enno TL, Del Bigio MR. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. *Exp Neurol*. 2006; 200(2): 311-20.
147. Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, Kawamoto K, Nishida T. Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha in a manner dependent on NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(2): 565-71.
148. Klezovitch O, Fernandez TE, Tapscott SJ, Vasioukhin V. Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice. *Genes Dev*. 2004; 18(5): 559-71.
149. Klinge P, Mühlendyck A, Lee S, Lüdemann W, Groos S, Samii M, et al. Temporal and regional profile of neuronal and glial cellular injury after induction of kaolin hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl*. 2002; 81: 275-7.
150. Klinge PM, Samii A, Mühlendyck A, Visnyei K, Meyer G-J, Walter GF, et al. Cerebral hypoperfusion and delayed hippocampal response after induction of adult kaolin hydrocephalus. *Stroke J Cereb Circ*. 2003; 34(1): 193-9.
151. Kondziella D, Eyjolfsson EM, Saether O, Sonnewald U, Risa O. Gray matter metabolism in acute and chronic hydrocephalus. *Neuroscience*. 2009; 159(2): 570-7.
152. Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(8): 4752-7.
153. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988; 53(1): 45-53.
154. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32: 149-84.
155. Kuban K, Sanocka U, Leviton A, Allred EN, Pagano M, Dammann O, et al. White matter disorders of prematurity: association with intraventricular hemorrhage and ventriculomegaly. *The Developmental Epidemiology Network. J Pediatr*. 1999; 134(5): 539-46.
156. Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, Nabeshima T, Wang J, Sonobe Y, et al. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res*. 2006; 1116(1): 12-8.
157. Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, et al. Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell*. 2006; 127(6): 1253-64.
158. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*. 2006; 394(Pt 3): 527-43.
159. Landoni VI, Schierloh P, de Campos Nebel M, Fernández GC, Calatayud C, Laponi MJ, et al. Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity. *PLoS Pathog*. 2012; 8(3): e1002632.
160. Lavado A, Oliver G. Six3 is required for ependymal cell maturation. *Development*. 2011; 138(24): 5291-300.

161. Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27: 653-79.
162. Leinonen V, Menon LG, Carroll RS, Dello Iacono D, Grevet J, Jääskeläinen JE, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Int J Alzheimers Dis.* 2011; 2011: 312526.
163. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 2000; 28(3): 713-26.
164. Limbrick DD, Baird LC, Klimo P, Riva-Cambrin J, Flannery AM, Pediatric Hydrocephalus Systematic Review and Evidence-Based Guidelines Task Force. Pediatric hydrocephalus: systematic literature review and evidence-based guidelines. Part 4: Cerebrospinal fluid shunt or endoscopic third ventriculostomy for the treatment of hydrocephalus in children. *J Neurosurg Pediatr.* 2014; 14 Suppl 1: 30-4.
165. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci.* 1998; 1(6): 494-500.
166. Lista S, Zetterberg H, Dubois B, Blennow K, Hampel H. Cerebrospinal fluid analysis in Alzheimer's disease: technical issues and future developments. *J Neurol.* 2014; 261(6): 1234-43.
167. Lopes L da S, Slobodian I, Del Bigio MR. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. *Exp Neurol.* 2009; 219(1): 187-96.
168. Lowery LA, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development.* 2005; 132(9): 2057-67.
169. Lowery LA, Sive H. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays.* 2009; 31(4): 446-58.
170. Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC. Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 2008; 28(14): 3804-13.
171. Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(6): 2305-12.
172. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 2002; 14(6): 477-92.
173. Maddahi A, Kruse LS, Chen Q-W, Edvinsson L. The role of tumor necrosis factor- α and TNF- α receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 107.
174. Malagón-Valdez J. [Congenital hydrocephalus]. *Rev Neurol.* 2006; 42 Suppl 3: S39-44.
175. Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.* 2008; 331(1): 165-78.
176. Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron.* 2003; 37(5): 751-64.

177. Mangano FT, McAllister JP, Jones HC, Johnson MJ, Kriebel RM. The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res.* 1998; 20(8): 697-704.
178. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(11): 2929-36.
179. Martin C, Alonso MI, Santiago C, Moro JA, De la Mano A, Carretero R, et al. Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27(7): 733-40.
180. Martínez Frias MI CI. Análisis clínico-epidemiológico de los recién nacidos con defectos congénitos registrados en el ECEMC: Distribución por etiología y por grupos étnicos. *Bol ECEMC Rev Dismor Epidemiol VI.* 2012; 2: 18-55.
181. Mc Guire C, Beyaert R, van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* 2011; 34(12): 619-28.
182. McAllister JP, Mangano FT, Jones HC, Kriebel RM. The microglial response in experimental infantile hydrocephalus. *Eur J Pediatr Surg.* 1998; 8 Suppl 1: 62.
183. McAllister JP, Miller JM. Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7: 7.
184. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation.* 2008; 5: 45.
185. McMenamin JB, Shackelford GD, Volpe JJ. Outcome of neonatal intraventricular hemorrhage with periventricular echodense lesions. *Ann Neurol.* 1984; 15(3): 285-90.
186. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.* 1997; 150(4): 1473-86.
187. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18(6): 704-9.
188. Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol.* 1992; 119(1): 179-89.
189. Milhorat TH, Kotzen RM, Anzil AP. Stenosis of central canal of spinal cord in man: incidence and pathological findings in 232 autopsy cases. *J Neurosurg.* 1994; 80(4): 716-22.
190. Miller JM, McAllister JP. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2007; 4: 5.
191. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003; 9(6): 540-9.
192. Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS. Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Brain Res.* 1988; 466(2): 183-90.
193. Miyazaki JA, Nabiyouni M, Zindah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81(4): 317-28.
194. Molofsky AV, Krencik R, Krenick R, Ullian EM, Ullian E, Tsai H, et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012; 26(9): 891-907.

195. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012; 7(1): 42-59.
196. Morales I, Farías G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation.* 2010; 17(3): 202-4.
197. Morest DK, Silver J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia.* 2003; 43(1): 6-18.
198. Mori T, Buffo A, Götz M. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2005; 69: 67-99.
199. Nakase T, Yoshida Y, Nagata K. Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia.* 2006; 54(5): 369-75.
200. Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP. Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia.* 2008; 56(8): 895-902.
201. Naureen I, Waheed KAI, Rathore AW, Victor S, Mallucci C, Goodden JR, et al. Fingerprint changes in CSF composition associated with different aetiologies in human neonatal hydrocephalus: inflammatory cytokines. *Childs Nerv Syst.* 2014; 30(7): 1155-64.
202. Nechiporuk T, Fernandez TE, Vasioukhin V. Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in *Dlg5*^{-/-} mice. *Dev Cell.* 2007; 13(3): 338-50.
203. Nelson DJ, Wright EM. The distribution, activity, and function of the cilia in the frog brain. *J Physiol.* 1974; 243(1): 63-78.
204. Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 2001; 11(10): 406-12.
205. Oderfeld-Nowak B, Orzyłowska-Sliwińska O, Sołtys Z, Zaremba M, Januszewski S, Janeczko K, et al. Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience.* 2003; 120(1): 31-40.
206. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci.* 2000; 113(Pt 17): 3073-84.
207. Oi S, Di Rocco C. Proposal of «evolution theory in cerebrospinal fluid dynamics» and minor pathway hydrocephalus in developing immature brain. *Childs Nerv Syst.* 2006; 22(7): 662-9.
208. Oi S, Shimoda M, Shibata M, Honda Y, Togo K, Shinoda M, et al. Pathophysiology of long-standing overt ventriculomegaly in adults. *J Neurosurg.* 2000; 92(6): 933-40.
209. Oi S. Classification of hydrocephalus: critical analysis of classification categories and advantages of «Multi-categorical Hydrocephalus Classification» (Mc HC). *Childs Nerv Syst.* 2011; 27(10): 1523-33.
210. Oka C, Matsuda H, Sarai N, Noma A. Modeling the calcium gate of cardiac gap junction channel. *J Physiol Sci JPS.* 2006; 56(1): 79-85.
211. Orellana JA, Sáez PJ, Shoji KF, Schalper KA, Palacios-Prado N, Velarde V, et al. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory

- agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(2): 369-99.
212. Owler BK, Pitham T, Wang D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2010; 7: 15.
 213. Paez P, Bátiz L-F, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez L-M, Rodríguez S, Jiménez AJ, et al. Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66(12): 1082-92.
 214. Page RB, Leure-duPree AE. Ependymal Alterations in Hydrocephalus. En: Wood JH, editor. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid 2* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1983 [citado 18 de agosto de 2015]. p. 789-820. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-9269-3_51
 215. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr*. 1978; 92(4): 529-34.
 216. Papile LA, Munsick-Bruno G, Schaefer A. Relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early childhood neurologic handicaps. *J Pediatr*. 1983; 103(2): 273-7.
 217. Paridaen JTML, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*. 2014; 15(4): 351-64.
 218. Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal*. 2010; 22(7): 977-83.
 219. Parnavelas JG. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci*. 2000; 23(3): 126-31.
 220. Partridge JC, Babcock DS, Steichen JJ, Han BK. Optimal timing for diagnostic cranial ultrasound in low-birth-weight infants: detection of intracranial hemorrhage and ventricular dilation. *J Pediatr*. 1983; 102(2): 281-7.
 221. Paul L, Madan M, Rammling M, Chigurupati S, Chan SL, Pattisapu JV. Expression of aquaporin 1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery*. 2011; 68(2): 462-73.
 222. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*. 1990; 63(2): 251-8.
 223. Perez Velazquez JL, Carlen PL. Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci*. 2000; 23(2): 68-74.
 224. Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Rodríguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech*. 2001; 52(5): 591-607.
 225. Peruzzo B, Pastor FE, Blázquez JL, Amat P, Rodríguez EM. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res*. 2004; 317(2): 147-64.
 226. Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2007; 67(12): 5727-36.

227. Philip AG, Allan WC, Tito AM, Wheeler LR. Intraventricular hemorrhage in preterm infants: declining incidence in the 1980s. *Pediatrics*. 1989; 84(5): 797-801.
228. Quencer RM. Intracranial CSF flow in pediatric hydrocephalus: evaluation with cine-MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1992; 13(2): 601-8.
229. Raimondi AJ. A unifying theory for the definition and classification of hydrocephalus. *Childs Nerv Syst*. 1994; 10(1): 2-12.
230. Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex*. 2003; 13(6): 541-9.
231. Rakic P. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev*. 2007; 55(2): 204-19.
232. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(20): 11981-6.
233. Rasin M-R, Gazula V-R, Breunig JJ, Kwan KY, Johnson MB, Liu-Chen S, et al. Numb and Numb1 are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci*. 2007; 10(7): 819-27.
234. Rathnasamy G, Ling E-A, Kaur C. Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligodendrocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species. *J Neurosci*. 2011; 31(49): 17982-95.
235. Reillo I, de Juan Romero C, García-Cabezas MÁ, Borrell V. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2011; 21(7): 1674-94.
236. Reinke SN, Broadhurst DL, Sykes BD, Baker GB, Catz I, Warren KG, et al. Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke*. 2014; 20(10): 1396-400.
237. Rekate HL. A consensus on the classification of hydrocephalus: its utility in the assessment of abnormalities of cerebrospinal fluid dynamics. *Childs Nerv Syst*. 2011; 27(10): 1535-41.
238. Rekate HL. The definition and classification of hydrocephalus: a personal recommendation to stimulate debate. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008; 5: 2.
239. Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H. Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(9): 1649-53.
240. Ricci S, Cusmai R, Fariello G, Fusco L, Vigevano F. Double cortex. A neuronal migration anomaly as a possible cause of Lennox-Gastaut syndrome. *Arch Neurol*. 1992; 49(1): 61-4.
241. Richter HG, Muñoz RI, Millán CS, Guiñazú MF, Yulis CR, Rodríguez EM. The floor plate cells from bovines express the mRNA encoding for SCO-spondin and its translation products. *Mol Brain Res*. 2001; 93(2): 137-47.
242. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. 1997; 20(12): 570-7.
243. Roales-Bujan R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaró A, et al. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells

- following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol.* 2012; 124(4): 531-46.
244. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides.* 2010; 31(4): 757-76.
 245. Rodríguez EM, Guerra MM, Vío K, González C, Ortloff A, Bátiz LF, et al. A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res.* 2012; 45(3): 231-41.
 246. Rodríguez-Pérez LM, Pérez-Martín M, Jiménez AJ, Fernández-Llebrec P. Immunocytochemical characterisation of the wall of the bovine lateral ventricle. *Cell Tissue Res.* 2003; 314(3): 325-35.
 247. Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E. Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *Am J Physiol.* 1980; 238(1): F42-9.
 248. Ross JM. Signo del limón. *Rev Argent Radiol.* 2014; 78(3): 181-3.
 249. Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull.* 2009; 80(4-5): 224-32.
 250. Rouach N, Avignone E, Mème W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, et al. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell.* 2002; 94(7-8): 457-75.
 251. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.* 2010; 468(7321): 214-22.
 252. Rubenstein E. Relationship of senescence of cerebrospinal fluid circulatory system to dementias of the aged. *Lancet.* 1998; 351(9098): 283-5.
 253. Rumack CM, Wilson SR, Charboneau JW. *Diagnóstico por ecografía.* Madrid, España: Marban; 1999.
 254. Russell DS. Hydrocephalus. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1955; 34: 160-75.
 255. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003; 83(4): 1359-400.
 256. Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MVL. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1711(2): 215-24.
 257. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M, Takano H, et al. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(23): 15194-9.
 258. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai H-H, Wong M, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature.* 2011; 478(7369): 382-6.
 259. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 2004; 427(6976): 740-4.

260. Sánchez-Camacho C, Rodríguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res Rev.* 2005; 49(2): 242-52.
261. Sarnat HB (a). Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol.* 1992; 8(3): 163-78.
262. Sarnat HB (b). Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992; 51(1): 58-75.
263. Sarnat HB, Darwish HZ, Barth PG, Trevenen CL, Pinto A, Kotagal S, et al. Ependymal abnormalities in lissencephaly/pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993; 52(5): 525-41.
264. Sarnat HB. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995; 54(1): 1-15.
265. Sarnat HB. Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 1998; 41(1): 14-28.
266. Sarnat HB. Regional ependymal upregulation of vimentin in Chiari II malformation, aqueductal stenosis, and hydromyelia. *Pediatr Dev Pathol.* 2004; 7(1): 48-60.
267. Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26(2): 85-91.
268. Sauvageot CM, Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12(3): 244-9.
269. Schmidek HH, Auer LM, Kapp JP. The cerebral venous system. *Neurosurgery.* 1985; 17(4): 663-78.
270. Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990; 144(1): 129-35.
271. Sevillano García MD, Cacabelos Pérez P, Cacho Gutiérrez J. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo y de su circulación: hidrocefalia, pseudotumor cerebral y síndrome de presión baja. *Form Médica Contin.* 2011; 10(71): 4814-24.
272. Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, et al. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(17): 1775-83.
273. Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, et al. Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet.* 2004; 36(1): 69-76.
274. Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1258: 9-18.
275. Shen XQ, Miyajima M, Ogino I, Arai H. Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg.* 2006; 105(6 Suppl): 459-64.
276. Sheth RD. Trends in incidence and severity of intraventricular hemorrhage. *J Child Neurol.* 1998; 13(6): 261-4.
277. Shim I, Ha Y, Chung JY, Lee H-J, Yang KH, Chang JW. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurgery.* 2003; 53(2): 416-25.
278. Siegel MJ. *Ecografía pediátrica.* Madrid: Marbán; 2004.

279. Sival DA, Felderhoff-Müser U, Schmitz T, Hoving EW, Schaller C, Heep A. Neonatal high pressure hydrocephalus is associated with elevation of pro-inflammatory cytokines IL-18 and IFN γ in cerebrospinal fluid. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008; 5: 21.
280. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WFA, Bátiz LF, Alvial G, Castañeyra-Perdomo A, et al. Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol.* 2011; 21(2): 163-79.
281. Skjolding AD, Rowland IJ, Sjøgaard LV, Praetorius J, Penkowa M, Juhler M. Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7: 20.
282. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol.* 1999; 155(1): 109-17.
283. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):7-35.
284. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005; 11(5): 400-7.
285. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 2005; 25(1): 10-8.
286. Spranger M, Fontana A. Activation of Microglia: A Dangerous Interlude in Immune Function in the Brain. *Neuroscientist.* 1996; 2(5): 293-9.
287. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970; 18(5): 315-33.
288. Sweetman B, Linninger AA. Cerebrospinal fluid flow dynamics in the central nervous system. *Ann Biomed Eng.* 2011; 39(1): 484-96.
289. Talhouk RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME. Gap junctional intercellular communication in hypoxia-ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol.* 2008; 84(1): 57-76.
290. Tamburrini G, Frassanito P, Iakovaki K, Pignotti F, Rendeli C, Murolo D, et al. Myelomeningocele: the management of the associated hydrocephalus. *Childs Nerv Syst.* 2013; 29(9): 1569-79.
291. Tarkowski E, Tullberg M, Fredman P, Wikkelso C. Normal pressure hydrocephalus triggers intrathecal production of TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 2003;24(5):707-14.
292. Taylor GA. Sonographic assessment of posthemorrhagic ventricular dilatation. *Radiol Clin North Am.* 2001; 39(3): 541-51.
293. Thompson DNP. Hydrocephalus. *Surg Oxf.* 2007;25(12):522-5.
294. Tortorolo G, Luciano R, Papacci P, Tonelli T. Intraventricular hemorrhage: past, present and future, focusing on classification, pathogenesis and prevention. *Childs Nerv Syst.* 1999; 15(11-12): 652-61.

295. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008; 117(2): 244-79.
296. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex.* 2003; 13(6): 580-7.
297. Trupp M, Jonsson P, Ohrfelt A, Zetterberg H, Obudulu O, Malm L, et al. Metabolite and peptide levels in plasma and CSF differentiating healthy controls from patients with newly diagnosed Parkinson's disease. *J Park Dis.* 2014; 4(3): 549-60.
298. Tullio AN, Bridgman PC, Tresser NJ, Chan CC, Conti MA, Adelstein RS, et al. Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol.* 2001; 433(1): 62-74.
299. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev.* 2003; 83(3): 871-932.
300. Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J. Tumor necrosis factor- α regulation of the Id gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. *Glia.* 1999; 26(2): 139-52.
301. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001; 63(3): 321-36.
302. Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, Ilundáin AA, Echevarría M, Machado A, et al. Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis.* 1999; 6(4): 245-58.
303. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol.* 1998; 5(3): 135-51.
304. Vural M, Yilmaz I, Ilikkan B, Erginoz E, Perk Y. Intraventricular hemorrhage in preterm newborns: risk factors and results from a University Hospital in Istanbul, 8 years after. *Pediatr Int.* 2007; 49(3): 341-4.
305. Wagner C, Batiz LF, Rodríguez S, Jiménez AJ, Páez P, Tomé M, et al. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003; 62(10): 1019-40.
306. Wagshul ME, Eide PK, Madsen JR. The pulsating brain: A review of experimental and clinical studies of intracranial pulsatility. *Fluids Barriers CNS.* 2011; 8(1): 5.
307. Wang H-W, Amin MS, El-Shahat E, Huang BS, Tuana BS, Leenen FHH. Effects of central sodium on epithelial sodium channels in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 299(1): R222-33.
308. Wang M-J, Huang H-Y, Chen W-F, Chang H-F, Kuo J-S. Glycogen synthase kinase-3 β inactivation inhibits tumor necrosis factor- α production in microglia by modulating nuclear factor κ B and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation.* 2010; 7: 99.
309. Watters O, O'Connor JJ. A role for tumor necrosis factor- α in ischemia and ischemic preconditioning. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 87.

310. Wei C-J, Francis R, Xu X, Lo CW. Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(20): 19925-36.
311. Weisz OA, Rodriguez-Boulan E. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 23): 4253-66.
312. Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci*. 1999; 2(5): 461-6.
313. Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development*. 2001; 128(19): 3759-71.
314. Williams MA, McAllister JP, Walker ML, Kranz DA, Bergsneider M, Del Bigio MR, et al. Priorities for hydrocephalus research: report from a National Institutes of Health-sponsored workshop. *J Neurosurg*. 2007; 107(5 Suppl): 345-57.
315. Wolf NI, Willemsen M a. a. P, Engelke UF, van der Knaap MS, Pouwels PJW, Harting I, et al. Severe hypomyelination associated with increased levels of N-acetylaspartylglutamate in CSF. *Neurology*. 2004; 62(9): 1503-8.
316. Woollam DHM, Millen JW. Anatomical considerations in the pathology of stenosis of the cerebral aqueduct. *Brain*. 1953; 76(1): 104-12.
317. Xu H, Zhang SL, Tan GW, Zhu HW, Huang CQ, Zhang FF, et al. Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience*. 2012; 218: 317-25.
318. Yamada S, Miyazaki M, Kanazawa H, Higashi M, Morohoshi Y, Bluml S, et al. Visualization of cerebrospinal fluid movement with spin labeling at MR imaging: preliminary results in normal and pathophysiologic conditions. *Radiology*. 2008; 249(2): 644-52.
319. Yamagata K, Tagami M, Ikeda K, Tsumagari S, Yamori Y, Nara Y. Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression during hypoxia and reoxygenation in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Glia*. 2002; 37(1): 1-7.
320. Yamagata K. Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem Int*. 2012; 60(1): 91-8.
321. Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, et al. Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). *J Neurosurg Pediatr*. 2011; 8(4): 411-6.
322. Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290(3): G496-504.
323. Yung YC, Mutoh T, Lin M-E, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, et al. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med*. 2011; 3(99): 99ra87.
324. Zhang A, Sun H, Wang X. Recent advances in metabolomics in neurological disease, and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405(25): 8143-50.

325. Zhang J, Piontek J, Wolburg H, Piehl C, Liss M, Otten C, et al. Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107(4): 1425-30.
326. Zigmond MJ, editor. Fundamental neuroscience. San Diego: Academic Press; 1999. 1600 p.

9. Anexos

ANEXO 1: Tampones y procedimientos para histoquímica e inmunohistoquímica

1.1. Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,3

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 28,5 g
- KH_2PO_4 4,39 g
- H_2O destilada hasta 1 litro
- Ajustar el pH a 7,3

1.2. Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,3

- | | <u>1X</u> | <u>5X</u> |
|--|--------------|---------------|
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 1,90 g | 9,28 g |
| - KH_2PO_4 | 0,43 g | 2,15 g |
| - NaCl | 7,22 g | 36,1 g |
| - H_2O destilada | hasta 1litro | hasta 1 litro |
| - Ajustar el pH a 7,3 | | |

1.3. Tampón TRIS-PBS 0,2 M, pH 7,8

- | | <u>1X</u> | <u>5X</u> |
|---|---------------|--------------|
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1,48 g | 7,4 g |
| - KH_2PO_4 | 0,48 g | 2,4 g |
| - NaCl | 7 g | 35 g |
| - TRIS | 5 g | 25 g |
| - NaN_3 | 0,20 g | 1 g |
| - H_2O destilada | hasta 1 litro | hasta 1litro |
| - Ajustar el pH a 7,8 | | |

1.4. Tampón TRIS-HCl-Urea 5 %, pH 9,5

- Urea 5 g
- Tampón TRIS-PBS 0,2 M hasta 100 ml
- Ajustar el pH a 9,5. No almacenar

1.5. Tampón TRIS-Carragenina-Tritón X-100 (TCT) 0,2 M, pH 7,8

- Tampón TRIS-PBS (0,2 M, pH 7,8) 100 ml
- Carragenina 0,7 g
- Tritón X-100 0,5 ml
- Ajustar el pH a 7,8 y almacenar a 4 °C.

1.6. Tampón citrato 0,1 M, pH 6

- Citrato de sodio dihidrato 29,41 g
- H₂O destilada hasta 1 litro

1.7. Hidratación y deshidratación

Hidratación

- Xileno (2 pases) 10 min
- Etanol 100° (2 pases) 10 min
- Etanol 96° 5 min
- Etanol 70° 5 min
- H₂O destilada 5 min

Deshidratación

- H₂O destilada 5 min
- Etanol 70° 5 min
- Etanol 96° 5 min
- Etanol 100° (2 pases) 10 min
- Xileno (2 pases) 10 min

ANEXO 2: Preparación de portaobjetos

2.1. Poli-L-lisinado de portaobjetos

Componentes

- | | |
|------------------------------|--------|
| - Solución de poli-L-lisina | 25 ml |
| - H ₂ O destilada | 225 ml |

Preparación

- Colocar los portaobjetos desengrasados en cestillas de plástico.
- Sumergir en una solución diluida 1:10 en H₂O destilada a partir de la solución de poli-L-lisina, durante 5 min a temperatura ambiente.
- Dejar secar durante 1 h a 60 °C o a temperatura ambiente durante 18 - 24 h.

2.2. Silanizado de portaobjetos

Componentes

- | | |
|-----------|--------|
| - Silano | 10 ml |
| - Acetona | 490 ml |

Preparación

- Colocar los portaobjetos desengrasados en cestillas de vidrio o metal.
- Sumergir en la solución de silano al 2 % en acetona durante 1 min a temperatura ambiente.
- Lavar en H₂O destilada durante 1 min
- Dejar secar durante 1 h a 60 °C o a temperatura ambiente durante 18 - 24 h.

ANEXO 3: Soluciones específicas de las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas/inmunofluorescencia

3.1. Solución desactivadora de la peroxidasa endógena

- | | |
|--|----------|
| - PBS 0,1 M, pH 7.3 | 217,5 ml |
| - Metanol | 25 ml |
| - Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) | 7,5 ml |

3.2. Diluyentes de anticuerpos primarios y secundarios para inmunohistoquímica y bloqueo de uniones inespecíficas.

- | | |
|-------------------------------------|--------------|
| - BSA | 1 g |
| - Tritón X-100 | 0.5 ml |
| - NaN ₃ (azida de sodio) | 0.1 g |
| - SNO/ SNrb | 5 ml/2 ml |
| - PBS 0,1 M, pH 7,3 | hasta 100 ml |

Con suero normal de oveja o conejo (SNO, SNrb) según si el segundo anticuerpo está obtenido, respectivamente, en oveja o conejo.

3.3. Intensificación con microondas en tampón TRIS-HCl-Urea

Los cortes a intensificar en el microondas han de estar montados en portaobjetos poli-L-lisinos o silanizados. Se colocan los portaobjetos en un *vaso coplin* con tampón TRIS-HCl y urea al 5 %. Se programa el microondas para dos ciclos de 5 min a 350 W de potencia, reponiendo el tampón evaporado después de cada ciclo. Se deja enfriar el tejido en el mismo tampón. Finalmente se lava con PBS.

3.4. Intensificación con microondas en tampón citrato 0,1 M

Se sigue el mismo procedimiento que en la intensificación en TRIS-HCl con urea al 5 %, pero utilizando tampón citrato 0,1 M, pH 7,8.

3.5. Intensificación con sulfato amónico de níquel

Se disuelve el sulfato amónico de níquel en PBS (40 mg/50 ml de PBS) y se filtra. Con el tampón obtenido se realiza la reacción histoquímica de la peroxidasa.

3.6. Reacción histoquímica de la peroxidasa

Se pesan y disuelven 0,05 g de DAB en 50 ml de tampón PBS, TRIS-PBS, o con PBS-níquel (pH 7,4). Se sumergen los portaobjetos en un *vaso coplin* conteniendo esta disolución. Se añaden 100 μ l de H₂O₂. Después de 10 min se lava con abundante agua corriente y se pasa a agua destilada. La reacción histoquímica se realiza en oscuridad.

ANEXO 4: LISTA DE PRODUCTOS Y REFERENCIAS COMERCIALES

- **BSA** (suero de albúmina bovina, Sigma, 05477)
- **D₂O** (óxido de deuterio; Sigma, 151882)
- **DAB** (3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorato; Sigma, D5637)
- **DPX** (medio de montaje permanente para cubreobjetos; BDH, 360294H)
- **Entellan** (medio de montaje permanente para cubreobjetos; Merck, 1.07961.0500)
- **Eosina hidro-alcohólica** (Panreac, 251301.1609)
- **Etanol** (Merck, 108543)
- **HCl** (ácido clorhídrico; Panreac, 181021.1211)
- **Hematoxilina de Harris** (Panreac, 253949.1611)
- **KCl** (cloruro potásico; Probus, 144370)
- **KH₂PO₄** (fosfato potásico monobásico; Sigma, P9791)
- **Medio de montaje para fluorescencia** (*Fluorecent Mounting Medium*; Dako, S-302380)
- **Metanol** (Merck, 822283)
- **Na₂HPO₄ · 2H₂O** (fosfato sódico dibásico, dihidratado; Sigma, 71643)
- **NaCl** (cloruro sódico; Sigma, S3014)
- **NaN₃** (azida de sodio; Panreac, 162712)
- **PAP-pen®** (Abcam, ab-2601)
- **Parafina/Histosec** (Merck, 1.11609)
- **Peróxido de hidrógeno** (Merck, 107298)
- **Poli-L-lisina** (solución de poli-L-lisina; Sigma, P8920)
- **Proteinasa K** (Sigma, P2308)
- **Silano** ((3-aminopropil)trietoxisilano; Sigma, A3648)
- **Suero normal de conejo** (SNrb; Sigma, R9133)
- **Suero normal de oveja** (SNO, obtenido en nuestro laboratorio)
- **Sulfato amónico de níquel** (Sigma, 09885)
- **TRIS** (Tris(hidroximetil)aminometano, Sigma, T1378)
- **TSP** (sal de sodio del ácido 3-(Trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d₄; Aldrich, 269913)
- **Tritón X-100** (Sigma, T8787)
- **Xileno** (Panreac, 141769.1611)

10. Publicaciones

10. Publicaciones

- 10.1 Ependymal denudation and alterations of the subventricular zona occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ, Weil B, Arráez MA, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(7): 595-604.
- 10.2 Aspectos Celulares y Moleculares del proceso de Estenosis del Acueducto de Silvio que conduce al desarrollo de Hidrocefalia Hereditaria. EM Rodríguez, C Wagner, F Bátiz, S Rodríguez, K, Vio, AJ Jiménez, MD Domínguez, JM Pérez-Fígares. *Investigación y Avances en Medicina Neonatal*. Editorial: Universidad de Oviedo. DL AS-1.864-05.
- 10.3 Premamilar Ventriculostomy. Dolores Domínguez Pinos y María I. Martínez León. *Learning Pediatric Imaging 100 Essential Cases*. Edit. Springer. ISBN: 978-3-642-16891-8.
- 10.4 Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ. *Acta Neuropathol*. 2012 Oct; 124(4): 531-46
- 10.5 A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. Rodríguez EM, Guerra MM, Vío K, González C, Ortloff A, Bátiz LF, Rodríguez S, Jara MC, Muñoz RI, Ortega E, Jaque J, Guerra F, Sival DA, den Dunnen WF, Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Pérez-Fígares JM, McAllister JP, Johanson C. *Biol Res*. 2012; 45(3): 231-42. Review.
- 10.6 Congenital hydrocephalus. Imaging for Clinicians. Dolores Domínguez Pinos y Antonio J Jiménez-Lara. *The 100 Cases a Pediatrician Must Be Familiar With*. ISBN 978-3-642-28628-5.
- 10.7 Increased levels of TNF α but not TGB β 1 are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. Jiménez AJ, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Gómez-Roldán MC, García-Bonilla M, Ho-Plagaro A, Roales-Buján R, Jiménez S, Roquero-Mañueco MC, Martínez-León MI, García-Martín ML, Cifuentes M, Ros B, Arráez MA, Vitorica J, Gutiérrez A, Pérez-Fígares JM. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Dec; 40(7): 911-32.
- 10.8 Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. Antonio J Jiménez, María-Dolores Domínguez-Pinos, María M Guerra, Pedro Fernández-Llebreg, José-Manuel Pérez-Fígares (2014), *Tissue Barriers*, 2014 Mar 19;2:e28426. doi: 10.4161/tisb.28426. eCollection 2014. Review.

- 10.9 Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. Guerra MM, Henzi R, Ortloff A, Lichtin N, Vío K, Jiménez AJ, Dominguez-Pinos MD, González C, Jara MC, Hinojosa F, Rodríguez S, Jara M, Ortega E, Guerra F, Sival DA, den Dunnen WF, Pérez-Fígares JM, McAllister JP, Johanson CE, Rodríguez EM. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Jul; 74(7): 653-71.

ORIGINAL ARTICLE

Ependymal Denudation and Alterations of the Subventricular Zone Occur in Human Fetuses With a Moderate Communicating Hydrocephalus

María Dolores Domínguez-Pinos, MD, Patricia Páez, Antonio-Jesús Jiménez, PhD, Bernardo Weil, MD, Miguel-Angel Arráez, MD, José-Manuel Pérez-Fígares, PhD, and Esteban-Martin Rodríguez, MD, PhD

Abstract

In mutant rodents, ependymal denudation occurs early in fetal life, preceding the onset of a communicating hydrocephalus, and is a key event in the etiology of this disease. The present investigation was designed to obtain evidence whether or not ependymal denudation occurs in 16- to 40-week-old human fetuses developing a communicating hydrocephalus ($n = 8$) as compared to fetuses of similar ages with no neuropathologic alterations ($n = 15$). Sections through the walls of the cerebral aqueduct and lateral ventricles were processed for lectin binding and immunocytochemistry using antibodies against ependyma, astroglia, neuroblasts, and macrophages markers. Anti-caveolin was used as a functional marker of the fetal ependyma. The structural and functional molecular markers are differentially expressed throughout the differentiation of the human fetal ependyma. Denudation of the ependyma of the aqueduct and lateral ventricles occurred in all fetuses developing a communicating hydrocephalus, including the youngest ones studied. The denuded surface area increased in parallel with the fetus age. The possibility is advanced that in many or most cases of human fetal hydrocephalus there is a common defect at the ependymal cell lineage leading to ependymal detachment. Evidence was obtained that in hydrocephalic human fetuses a process to repair the denuded areas takes place during the fetal life. In hydrocephalic fetuses, detachment of the ependyma of the lateral ventricles resulted in the (i) loss of the germinal ependymal zone, (ii) disorganization of the subventricular zone and, (iii) abnormal migration of neuroblasts into the ventricular cavity. Thus, detachment of the ependymal layer in hydrocephalic fetuses would not only be associated with the pathogenesis of hydrocephalus but also to abnormal neurogenesis.

Key Words: Abnormal neurogenesis, Ependymal defect, Ependymal denudation, Fetal human hydrocephalus, Neuroblasts, Subventricular zone.

INTRODUCTION

Discontinuities of the ependymal lining the brain cavities, in particular the lateral ventricles, have been associated with hydrocephalus (1, 2). In human cases of hydrocephalus such an ependymal loss has been regarded as resulting from the ventricular dilatation due to the accumulation of cerebrospinal fluid (CSF) (1, 2). According to Sarnat, the extent of the ependymal denudation correlates with the degree of dilatation of the lateral ventricles, and alterations of the ependyma in human hydrocephalus of fetal life and early infancy are not primary in the pathogenesis (2).

However, the view that ependymal loss is a consequence of ventricular dilatation has been contested by recent investigations carried out in natural and experimental mutant mice, which provided strong evidence that hydrocephalus may result from a primary alteration of the ependymal cell lineage (3–7). Thus, in the *hyh* mouse, a programmed denudation of the ventral ependymal occurring early in the fetal life precedes the onset of a moderate communicating hydrocephalus (3), and the denudation of the dorsal ependyma of the cerebral aqueduct occurring shortly after birth leads to aqueductal obliteration and severe hydrocephalus (4). Hydin is a transmembrane protein that in the brain is exclusively expressed in the ciliated ependyma (5). The experimental mutation of the *hydin* gene and the naturally occurring mutation of such a gene in the *hy3* mutant is associated with hydrocephalus and most likely the cause (5). Musashi proteins are RNA-binding proteins; two of them, *msi1* and *msi2*, are expressed in neural precursor cells and in all ependymal cells. The disruption of the *msi1* gene causes an abnormal differentiation of the ependyma of the cerebral aqueduct, aqueductal stenosis, and hydrocephalus (6). A transgenic mouse with an insertion that prevents the expression of a variant transcript of RFX4 (member of the regulatory factor-X family of winged-helix transcription factors) resulted in a missing subcommissural organ and the development of congenital hydrocephalus (7). The subcommissural organ is an ependymal gland located in the roof of the aqueduct (8).

From the Departamento de Biología Celular (MDD-P, PP, A-JJ, J-MP-F), Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain; Servicios de Anatomía Patológica y de Neurocirugía (BW, M-AA), Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain; Instituto de Histología y Patología (E-MR), Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Send correspondence and reprint requests to: Esteban-Martin Rodríguez, Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Casilla (P. O. Box) 567, Valdivia, Chile; E-mail: erodrigu@uach.cl

Supported by grants from FIS, PI 030756, and Red CIEN, Instituto de Salud Carlos III, Spain (JMP-F); and Fondecyt 1030265, Chile (EMR).

Therefore, the statement by Sarnat that there are no known genetic diseases specifically affecting the ependyma should be reconsidered, at least with respect to the primary role of ependyma in animal hydrocephalus (2). Indeed, there is not yet evidence that such a primary alteration of the ependyma may also occur in human hydrocephalus.

Whether the ependymal loss in human hydrocephalus is only the result of stretching and tearing of the ependymal lining caused by ventricular dilatation in severe hydrocephalus or a primary pathologic event of the ependymal cells occurring prior to the onset of hydrocephalus needs to be clarified. Within the limitations of research in human hydrocephalus, the present investigation was designed to determine whether ependymal denudation occurs in fetuses developing a communicating hydrocephalus with moderate dilatation of the ventricular cavities. Fetuses of similar ages with no neuropathologic alterations were used as controls.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The brain from 8 fetuses with communicating hydrocephalus and 15 fetuses with clinically normal development and no neuropathologic alterations from the Pathology Department of Carlos Haya Hospital, Málaga, Spain, were selected for the present investigation. Cases of hydrocephalus included (i) 4 isolated hydrocephalus of 16 weeks (female), 30 weeks (male), 31 weeks (male), and 36 weeks (female); (ii) 3 hydrocephalus associated with lumbosacral meningocele of 20 weeks (male), 22 weeks (female), and 36 weeks (male); the latter had in addition prosencephaly; (iii) one female fetus of 40 weeks with hydrocephalus associated with Potter syndrome. The cases used as control for the present investigation included (i) 6 spontaneous abortions of 16 weeks (2 males and one female), 21 weeks (male) and 30 weeks (one male and one female); (ii) 2 therapeutic interruptions of pregnancy at 12 weeks (male) and 22 weeks (male); (iii) 5 placenta defects of 21 weeks (female), 25 weeks (male), 30 weeks (male), 31 weeks (male), and 33 weeks (male); (iv) one Potter syndrome (21 weeks, male) with no neuropathologic alterations; (v) one sudden death (37 weeks, male).

Methods

The brains obtained from all fetuses were fixed by immersion in 5% formaldehyde for 2 days. Coronal cuts to expose the ventricles were performed, which allowed us to evaluate the volume of the ventricular cavities and the patency of the cerebral aqueduct. Blocks of tissue containing various regions of the walls of the lateral ventricles and of the cerebral aqueduct were obtained and then processed for paraffin embedding. Serial sections from each block were obtained and mounted individually on separate poly L-lysine coated slides. Adjacent sections were stained with hematoxylin and eosin or processed for lectin binding or immunocytochemistry.

Lectin Binding

The lectin *Limax flavus* agglutinin (LFA) with affinity exclusively for sialic acid was used. Unlabeled LFA (Calbiochem,

San Diego, CA) was used at a concentration of 7 µg/ml in 0.1M Tris buffer, pH 7.3. The lectin-binding site was revealed by the immunoperoxidase method using anti-LFA serum (raised by E. M. Rodríguez, Valdivia, Chile).

Immunocytochemistry

Sections to be immunoreacted were irradiated by microwave; the slides were immersed in a Coplin jar filled with Tris-HCl buffer, pH 9.5, containing 5% urea, and irradiated in a microwave oven, set at 900 W, 2 sessions, 5 minutes each. The immunoperoxidase method of Sternberger et al was applied (9). The following primary antibodies were used: (i) CD99, monoclonal, against human p30 and p32 plasma membrane glycoproteins expressed by several cell types including the ependyma (10) (Clone 12E7, Dako, Denmark); 1:50 dilution; (ii) anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP), raised in rabbit (Sigma, St. Louis, MO), 1:100 dilution; (iii) anti-vimentin raised in goat (Sigma, Madrid, Spain), 1:500 dilution; (iv) a monoclonal antibody specific for human macrophages (Sigma), 1:400 dilution; (v) anti-β III tubulin, monoclonal (Sigma), 1:5000 dilution; (vi) anti-caveolin-1, raised in rabbit, affinity purified (N-20; Santa Cruz Biotechnology, INC., San Diego, CA), 1:2000 dilution. Incubation in the primary antibody was in a moist chamber for 18 hours. Anti-rabbit IgG raised in goat (Sigma), anti-mouse immunoglobulins (Sigma), and anti-goat IgG developed in rabbit (Sigma) were used at a dilution 1:50, for 1 hour. PAP complexes using anti-peroxidase developed in rabbit, goat or mouse (Sigma) were used at a dilution of 1:100, 1:100, and 1:200, respectively, for 30 minutes. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) was used as electron donor. All antibodies were diluted in 0.01M buffered phosphate saline, pH 7.3. Omission of the incubation in the primary antibody was used as a control for the immunoreaction.

RESULTS

Ependyma of Nonhydrocephalic and Hydrocephalic Fetuses

The ependyma of hydrocephalic and nonhydrocephalic fetuses displayed similar structural and immunocytochemical characteristics. The study included 15 nonhydrocephalic fetuses ranging in age between 12 and 37 weeks and 8 hydrocephalic fetuses between 16 and 40 weeks. All nonhydrocephalic and hydrocephalic fetuses displayed an open cerebral aqueduct (Fig. 1D). All samples from the cerebral aqueduct and lateral ventricles from nonhydrocephalic fetuses examined were lined by a continuous ependymal lining (Figs. 2, 3). The youngest fetuses studied (12–25 weeks) displayed a pseudostratified immature ependyma formed by elongated cells with their major axis lying perpendicular to the ventricular surface (Fig. 1A, B, F, G). Most of the cells lacked cilia and few had only one or very few cilia (Fig. 2B); many cells processes originated in the stratified ependyma projected deeply into the neuropil (Fig. 1B, F). Most of the cells lining the lateral ventricles and the aqueduct displayed GFAP immunoreactivity (Fig. 1B) and were strongly reactive with the CD99 antibody

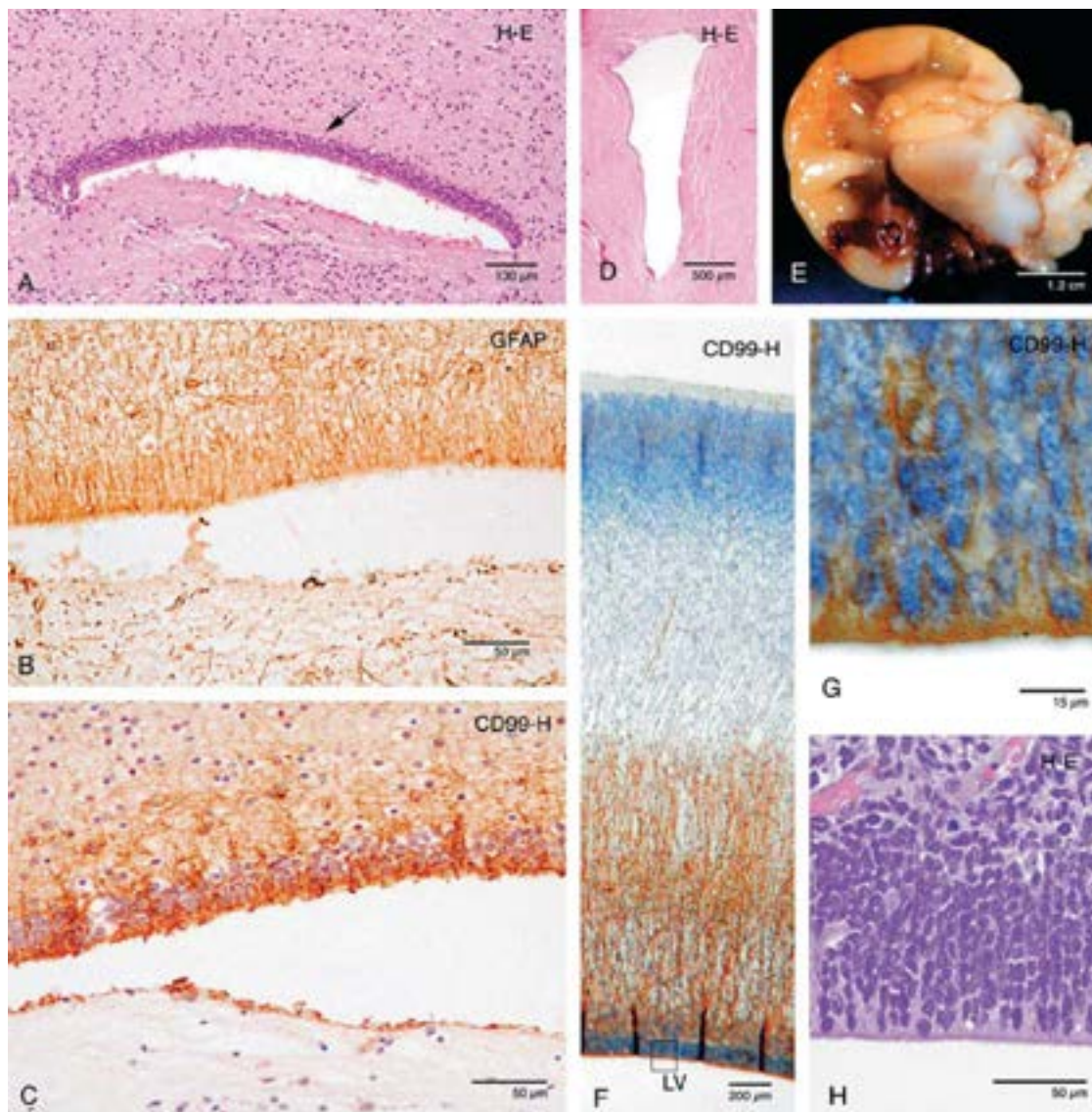


FIGURE 1. Female hydrocephalic 16-week-old fetus. (A–C) Adjacent sections through the aqueduct stained with hematoxylin and eosin (A), and immunostained for GFAP (B) and with CD99 (C). (A) The ventral ependyma has detached (open arrow) and the dorsal ependyma remains intact (solid arrow). (D) Transverse section through the wide-open cerebral aqueduct of a 40-week-old male fetus with hydrocephalus associated with Potter syndrome. Hematoxylin and eosin stain. (E) Macroscopic view of the brain showing the dilatation of a lateral ventricle (asterisk). (F–H) Sections through the wall of a lateral ventricle immunostained with CD99 and hematoxylin (F, G), and stained with hematoxylin and eosin (H). The area framed in panel (F) is shown at higher magnification in panel (G). Magnifications: (A) 90×; (B) 240×; (C) 280×; (D) 17×; (E) 0.9×; (F) 40×; (G), 800×; (H) 340×.

(Fig. 1C, F, G). Mitotic figures were frequently seen in deep regions of the stratified ependyma (Fig. 1G).

In the 29- to 40-week-old fetuses the immature ependyma progressively differentiated into a single layer of multiciliated ependymal cells that were strongly reactive with anti-vimentin (Fig. 3C) and weakly reactive with anti-CD99. This ependyma showed a distinct glycocalyx rich in sialic acid residues as revealed by the lectin LFA (Fig. 3B). In the aqueduct and lateral ventricles, 2 populations of ependymal cells were visualized; one displayed long basal processes and GFAP

immunoreactivity and the other was not reactive for GFAP and apparently lacked basal processes (Fig. 4G). No mitotic figures were seen in the ependyma of 29- to 40-week-old fetuses.

The cholesterol-binding proteins caveolins 1 and 2 are the main component of noncoated plasma membrane invaginations known as caveolae. In all of the samples the antibody against caveolin-1 reacted exclusively with the smooth muscle cells of blood vessels and the ependyma. In the lateral ventricles of nonhydrocephalic fetuses and in the nondetached ependyma of hydrocephalic fetuses anti-caveolin (i) reacted

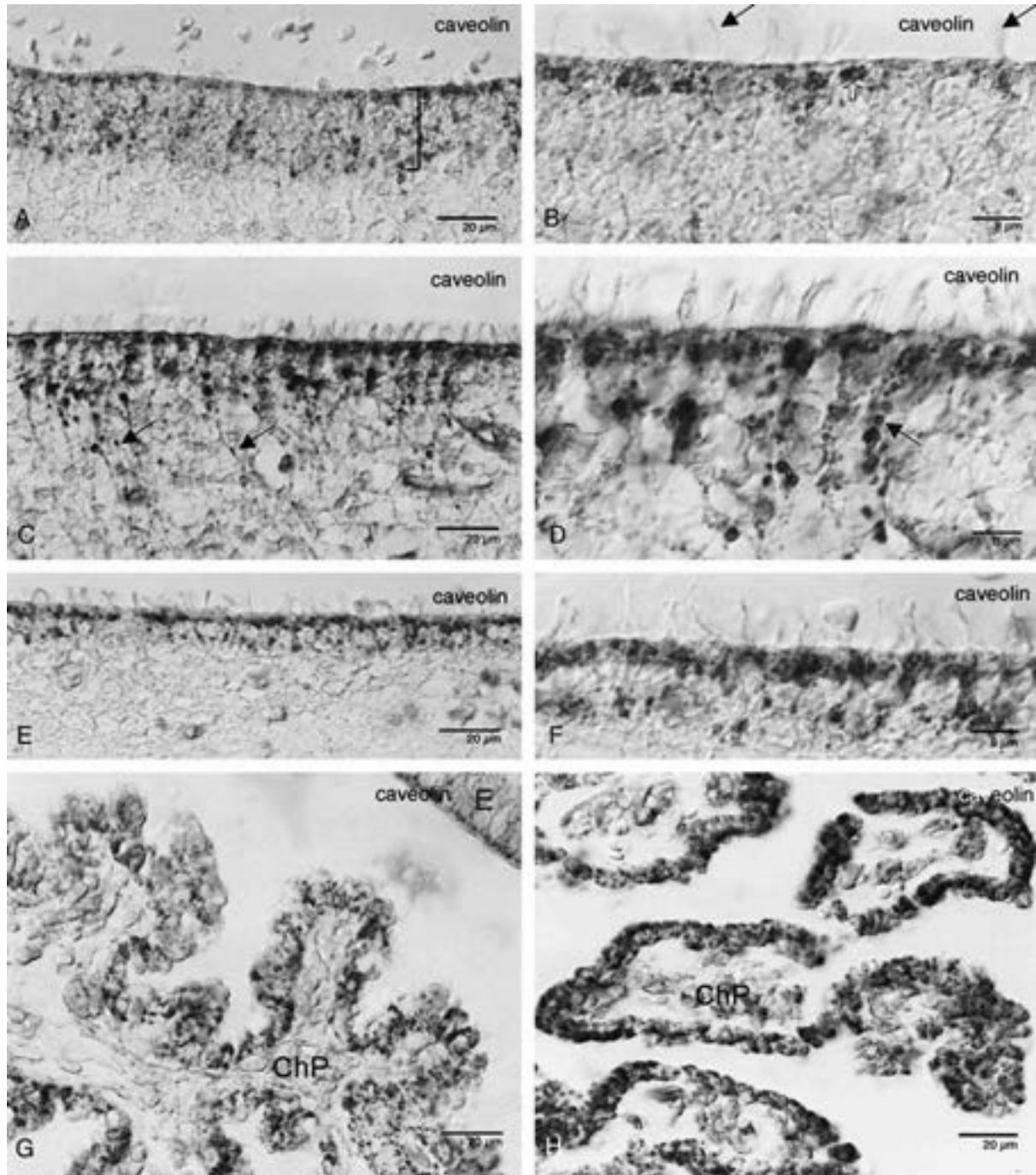


FIGURE 2. (A–H) Sections through the wall of the lateral ventricles and choroid plexus immunostained for caveolin-1. (A, B) Wall of a lateral ventricle of a nonhydrocephalic 16-week-old fetus. The immature ependyma is reactive (bracket); the immunoreaction is especially strong in the cells facing the ventricle (open arrow). Solid arrows point to cells apparently displaying only one cilium. (C, D) Wall of a lateral ventricle of a nonhydrocephalic 31-week-old fetus. Immunoreactive caveolin is present in the cell body and basal processes (arrows) of ependymal cells. (E, F) Wall of a lateral ventricle of a hydrocephalic 40-week-old fetus. (G) Choroid plexus (ChP) of a nonhydrocephalic 16-week-old fetus. E, immature ependyma. (H) ChP of a hydrocephalic 20-week-old fetus. Magnifications: (A, C, E, G, H) 500 \times ; (B, D, F) 1,250 \times .

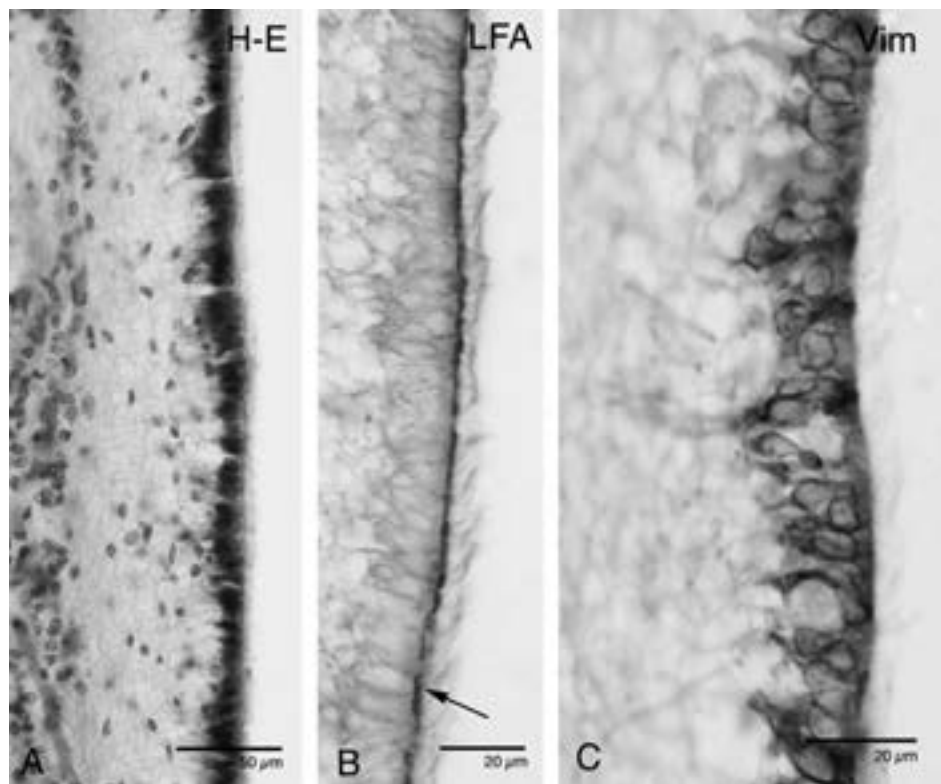


FIGURE 3. (A–C) Sections through the wall of a lateral ventricle of a nonhydrocephalic (sudden death) 37-week-old male fetus. (A) Hematoxylin and eosin stain. (B) *Limax flavus* agglutinin (LFA) binding to the ependymal glycocalyx (arrow). (C) Immunostaining for vimentin. Magnifications: (A) 320×; (B) 650×; (C) 850×.

weakly with all cells forming the stratified immature ependyma of the 16- and 20-week-old fetuses; the basal processes of these cells were not reactive (Fig. 2A); (ii) immunostained strongly the more mature ependyma of the 30- to 33-week-old fetuses; the reaction was strong in the supranuclear region of the cytoplasm and in the long basal processes (Figs. 2C); (iii) in the monolayered matured ependyma of the 40-week-old fetus the immunoreactive caveolin appeared as distinct masses located in the supra- and infra-nuclear regions of the cytoplasm (Fig. 2E).

In the choroid plexus of all hydrocephalic and nonhydrocephalic fetuses studied, including the youngest ones, caveolin was strongly expressed by all choroidal ependymal cells, with the immunoreaction distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2G, H).

Ependymal Denudation Is a Common Feature of Hydrocephalic Fetuses

The 8 hydrocephalic fetuses investigated had the lateral and third ventricles dilated (Fig. 1E), an open cerebral aqueduct (Fig. 1D) and were regarded as communicating hydrocephalus. In the younger fetuses (16–22 weeks) the areas of the walls of the aqueduct and lateral ventricles displaying ependymal denudation were consistently present, but not extensive (Fig. 1A). The denuded areas were not covered by astrocytes or other organized cell elements, leaving the neuropil directly exposed to the ventricular lumen (Fig. 1A–C); no microglia/macrophage cells (see below) were seen in the vicinity of the denuded areas. The nondenuded areas of the young fetuses

were lined by a neuroepithelium/immature ependyma that did not differ from that of nonhydrocephalic fetuses of the same/similar age with respect to the multilayered arrangement and immunoreactivity of the ependymal cells (Fig. 1A–C, F, H). Indeed, the latter expressed GFAP (Fig. 1B), p30/32 glycoproteins (Fig. 1C, F, G), and caveolin.

The surface area devoid of ependyma increased as the fetus developed. In the most mature fetuses investigated (36 and 40 weeks), the surface area showing ependymal denudation roughly matched that lined by ependyma (Fig. 4A, B). In the lateral ventricle, large denuded areas alternated with nondenuded areas (Fig. 4A, B). The latter were lined by a monolayered ciliated ependyma (Fig. 4C) that displayed a thick glycocalyx that was rich in sialic acid residues (Fig. 4F). In these areas the ependymal cells and many subependymal cells were reactive for CD99 (Fig. 4C, E). Approximately half of the population of the ependymal cells expressed GFAP (Fig. 4G), and all of them expressed caveolin.

In the oldest fetuses studied (36 and 40 weeks), the denuded areas of the lateral ventricles were characterized by (i) being mostly occupied by a dense plexus of cells processes reactive for CD99 and GFAP (Figs. 4D, G, 5D); (ii) the presence of numerous cells displaying short radiating processes labeled with the antibody against human macrophages, and most likely corresponding to microglia/macrophage cells (Fig. 5E–H). These cells were also seen lying on the exposed surface of the denuded areas. In the nondenuded areas, these microglia/macrophage cells were not seen in the vicinity of the ependyma but deep into the neuropil (Fig. 5E, G).

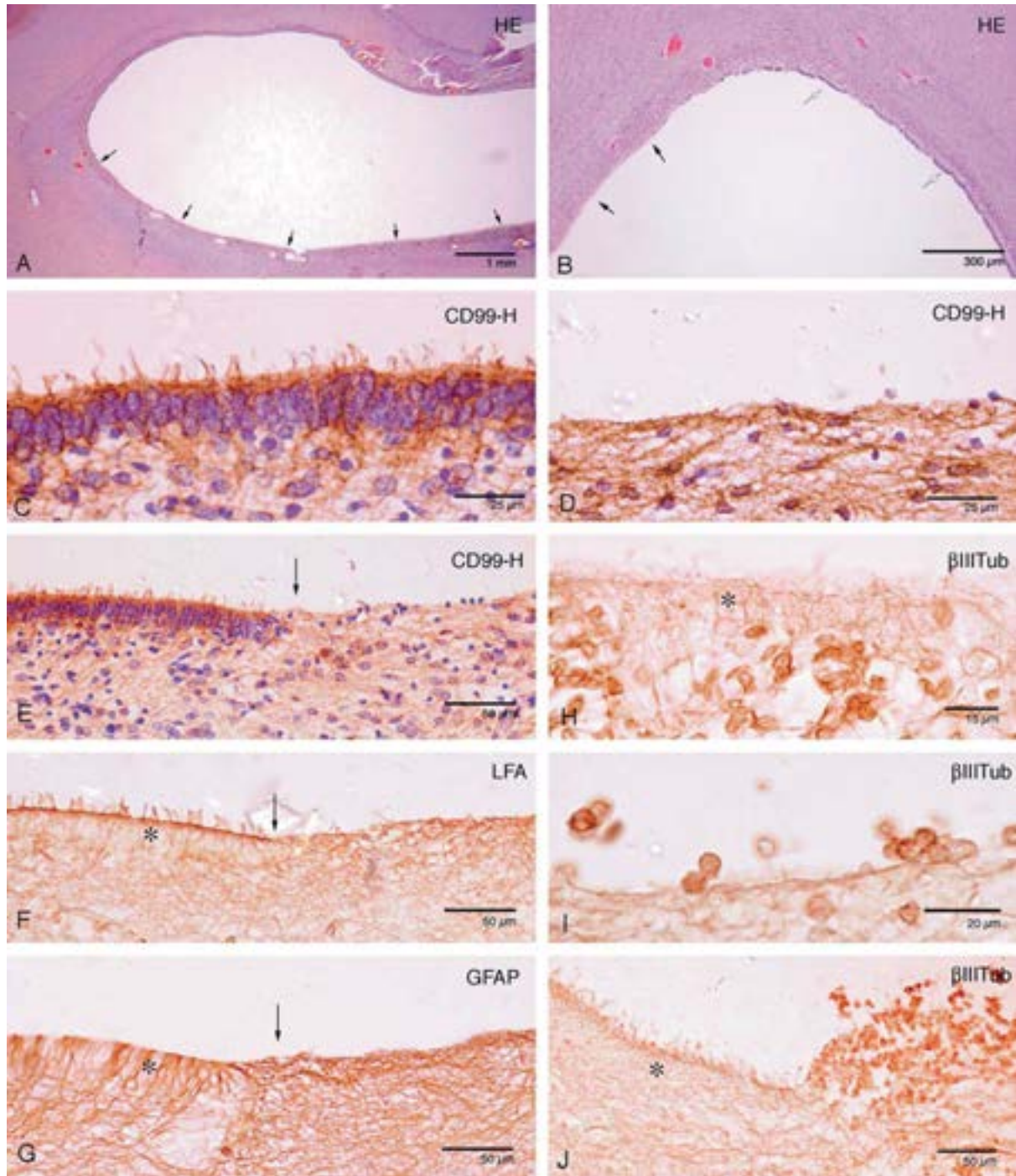


FIGURE 4. (A, B) Lateral ventricle of a 40-week-old hydrocephalic fetus. Hematoxylin and eosin stain showing nondenuded (open arrows) and denuded (solid arrows) areas. (C–J) Lateral ventricle of a 36-week-old hydrocephalic fetus. (C) Nondenuded area. Immunostaining with CD99 and hematoxylin. (D) Denuded area. Immunostaining with CD99 and hematoxylin. (E–G) Adjacent sections through denuded and nondenuded (asterisk) zones. The nondetached ependyma reacted with CD99 (E), LFA (F), and anti-GFAP (G). Vertical arrows point to border between both zones. (H–J) Immunostaining for β III tubulin. (H) Nondenuded area. A layer of neuroblasts is seen under the ependyma (asterisk). (I) Denuded area. Clusters of neuroblasts are seen on the denuded neuropil. (J) A large mass of neuroblasts protrudes into the ventricle. Asterisk denotes nondenuded area. Magnifications: (A) 12 \times ; (B) 56 \times ; (C, D) 560 \times ; (E–G) 280 \times ; (H) 730 \times ; (I) 750 \times ; (J) 240 \times .

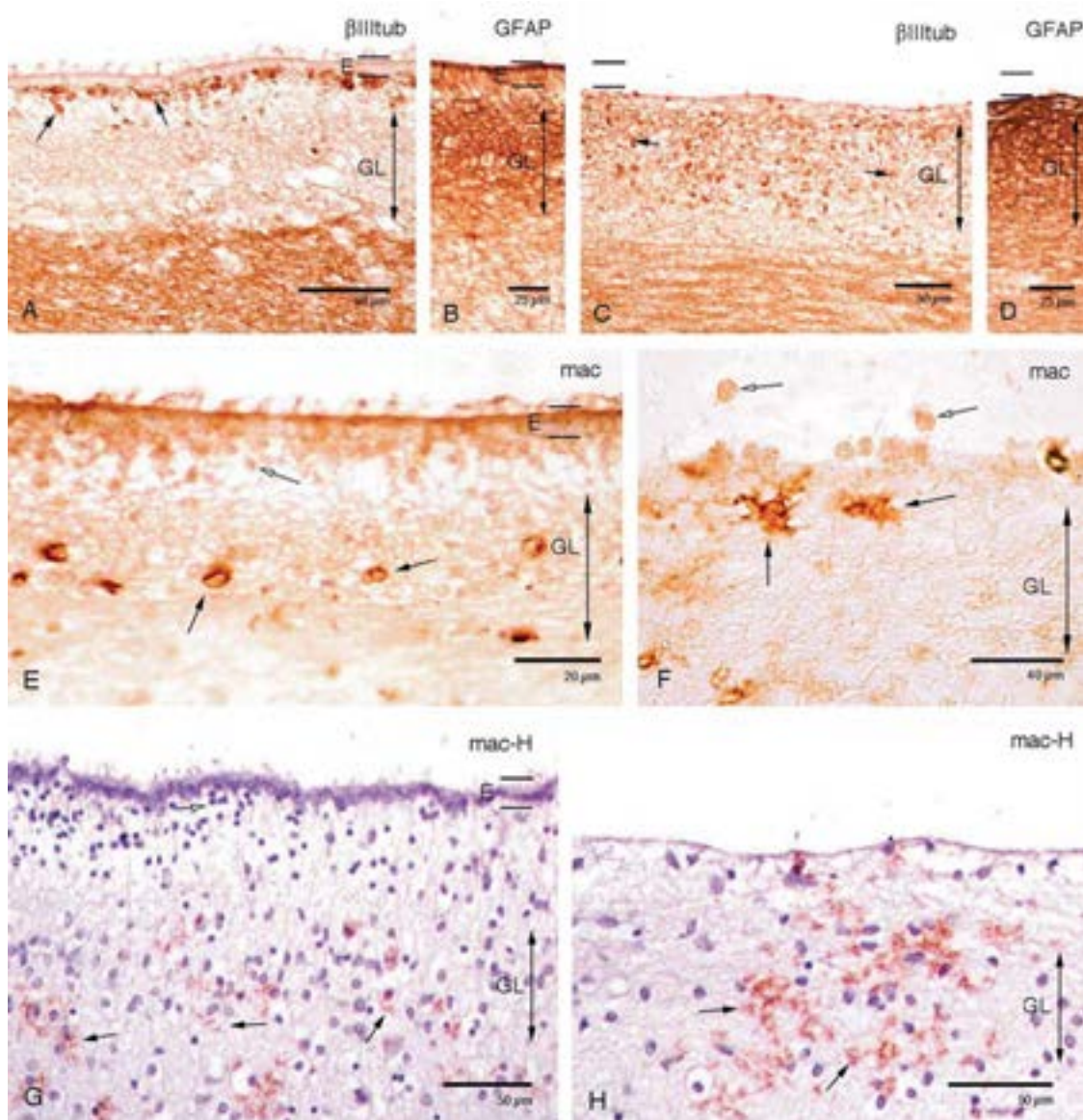


FIGURE 5. (A–F) Lateral ventricle of a 40-week-old hydrocephalic fetus. (A) Nondenuded area. Immunostaining for β III tubulin. E, ependymal zone; the subventricular zone contains a thin layer of neuroblast (solid arrows) and a thick glial layer (GL). (B) Adjacent section immunostained for GFAP. (C) Denuded area. Immunostaining for β III tubulin. Neuroblasts (solid arrows) appear distributed throughout the GL. (D) Adjacent section immunostained for GFAP. The ependymal zone is missing and the GL continues strongly reactive. (E) Nondenuded area. Immunostaining with the antibody specific for human macrophages. Solid arrow, endothelial cells; open arrow, neuroblasts. (F) Denuded area. Immunostaining with the antibody specific for human macrophages. Solid arrows, immunoreactive cells; open arrows, nonreactive cells in the ventricular lumen. (G, H) Lateral ventricle of a 36-week-old hydrocephalic fetus. Immunostaining with the antibody specific for human macrophages and hematoxylin. (G) Nondenuded area. (H) Denuded area. Open arrow, neuroblasts; solid arrows, immunoreactive cells. Many immunoreactive cells (arrows) occupy the denuded subventricular zone. Magnifications: (A) 340 \times ; (B) 320 \times ; (C) 220 \times ; (D) 320 \times ; (E) 800 \times ; (F) 425 \times ; (G) 320 \times ; (H) 400 \times .

In the neuropil underlying the large denuded areas there were ependymal rosettes with a distinct lumen and cell clusters that were reactive with anti-CD99; unlike the surface ependyma, these cells did not display immunoreactive vimentin and little or no reactive GFAP.

No alterations were detected in the choroid plexus of hydrocephalic fetuses. Thus, the ependymal choroidal cells

displayed normal cytologic features and, compared with those of nonhydrocephalic fetuses, showed no differences concerning the amount and spatial distribution of immunoreactive caveolin (Fig. 2G, H).

The subcommissural organ was found in some of the hydrocephalic and nonhydrocephalic fetuses and will be the subject of a special study.

In Hydrocephalic Fetuses the Subventricular Zone Becomes Disorganized and Neuroblasts Reach the Ventricular Cavity

Areas of the lateral ventricles of the 36- and 40-week-old hydrocephalic fetuses where ependymal denudation has not occurred displayed a well-organized subventricular zone. This zone is formed by (i) a single layer of multiciliated ependymal cells reactive for GFAP; (ii) a thin layer of small spherical cells reactive for β III tubulin, most likely corresponding to neuroblasts; (iii) a thick fibrous glial layer reactive for GFAP; and (iv) a fibrous neural layer reactive for β III tubulin (Figs. 4H, 5A, B). In the areas where ependymal denudation had occurred, the subventricular zone showed a distinct alteration, namely, that the β III tubulin-positive neuroblasts had apparently increased in number and where distributed throughout the GFAP-positive glial layer (Fig. 5C, D). In the areas devoid of ependyma, small clusters of neuroblasts lying on the free surface were seen (Fig. 4I). Large masses of neuroblasts protruding into the ventricular lumen through the denuded areas were frequently seen (Fig. 4J).

DISCUSSION

In the human, ependymal cells differentiate from the neuroepithelium along a caudal-rostral gradient; it starts at about the fourth week of gestation and is completed at approximately gestational week 22 (11, 12). Structural proteins such as vimentin, GFAP, and certain cytokeratins are expressed by the human ependyma following a temporal and spatial pattern (12, 13). In regions other than the lateral ventricles, ependymal cells express GFAP at early gestational period as compared with the ependyma of the lateral ventricles that expresses such a protein during the second half of the fetal life. By the time of birth only a few ependymal cells of the lateral ventricle still express GFAP (12), supporting the view that the ependyma of the lateral ventricles is the last one to complete its differentiation.

Caveolin is a distinct molecular marker of the caveolae-mediated endocytosis and transcytotic pathway (14–16). In the central nervous system of adult rats, caveolae-mediated endocytosis occurs in all ciliated ependymal cells, in the ependymal cell of choroid plexus, and in tanycytes (16). As a key functional molecule, its expression in the immature ependyma of the youngest fetuses indicates that the complex process of endocytosis/transcytosis starts to operate in these cells at early stages of brain development. The location of immunoreactive caveolin in the apical and basal poles of the immature and immature ependymal cells suggests that these cells internalize compounds from the CSF and from the intercellular space.

Since the choroid plexus of the nonhydrocephalic and hydrocephalic fetuses showed no differences in the amount and cellular distribution of immunoreactive caveolin in the ependymal cells of the choroid plexus, and caveolin being a key functional marker, it may be postulated that fluid endocytosis/transcytosis in the choroid plexus of hydrocephalic fetuses is not affected. Furthermore, the lack of ependymal denudation in the choroid plexus of hydrocephalic fetuses

resembles the situation of the hydrocephalic mutant *hyh* mice (3) and further supports the distinct characteristics of this ependyma as compared with the ciliated ependyma lining the ventricles (4, 17).

Denudation of the Ciliated Ependyma Occurs in All Fetuses Developing a Communicating Hydrocephalus

According to recent investigations in animals with spontaneous hereditary hydrocephalus, ependymal denudation is a phenomenon that precedes and triggers the onset of hydrocephalus early in the fetal life (3, 5, 6). In the present investigation the lateral ventricles of the 8 hydrocephalic fetuses displayed ependymal denudation, whereas this pathology was not found in any of the 15 nonhydrocephalic fetuses analyzed. This suggests that in human, as in certain animal mutants, ependymal denudation may be related with the onset and/or early stages of hydrocephalus. This possibility is further supported by the fact that the youngest hydrocephalic fetus studied (16 weeks) already displayed ependymal denudation. Discontinuities in the ependymal lining of hydrocephalic fetuses associated with a proliferation of astrocytes have also been reported by Sarnat (11). The present findings in the nonhydrocephalic fetuses do not agree with those of Dooling et al, who studied 111 brains of human fetuses with absence of gross defects and found that they all presented small areas of focal ependymal loss without prominent subependymal gliosis (18). These authors speculated that this ependymal defect, which occurs more frequently in the early third trimester of gestation, results from a normal modeling process taking place in the growing brain. Without information regarding the extent of the denuded areas and of the gliosis occurring in these areas it is difficult to compare these findings with the present results.

In the mutant *hyh* mouse, ependymal denudation occurs as a programmed process that parallels the process of ependymal differentiation, so that ependymal detachment occurs at certain specific sites and times of development (3). In the human hydrocephalic fetuses, ependymal denudation appears to occur throughout the studied period (16–40 weeks), as judged by the presence of denuded areas with and without astrocyte scar. This raised the question whether the mechanism leading to the detachment of the thick multilayered immature ependyma is the same operating in the detachment of the single matured ciliated ependyma (see below).

Mechanism(s) Underlying the Ependymal Denudation

An important issue that has been raised recently is whether ependymal denudation is the result or the cause of hydrocephalus. It has long been sustained that the ependymal loss is a consequence of the expansion of the ventricular cavities occurring in hydrocephalic patients (1, 2). According to Sarnat, the extent of the ependymal denudation correlates with the degree of dilatation of the lateral ventricles and hydrocephalic human fetuses would not be primary in the pathogenesis (2).

Recent investigations carried out in natural and experimental mutant mice have provided strong evidence that hydrocephalus may result from a primary alteration of the

ependymal cell lineage (3–7). In the *hyh* mouse, a programmed denudation of the ventral ependyma that occurs early in fetal life precedes the onset of a communicating hydrocephalus (3), and the denudation of the dorsal ependyma of the cerebral aqueduct occurring after birth leads to aqueductal obliteration and a severe hydrocephalus (4). It has recently been elucidated that the mutated gene in the *hyh* mouse corresponds to the gene encoding for soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein α (α Snap) (19, 20). α Snap plays a key role in the intercompartmental transport of proteins, including transport to the plasma membrane. The mutated α Snap in the *hyh* mouse results in altered localization of many surface proteins of neural stem cells, such as E-cadherins and β -catenin (19, 21). It seems highly likely that this defect would also be expressed in the ependymal cell lineage of the *hyh* mutant and the cause of the ependymal detachment occurring in this hydrocephalic mouse (3, 4). The immunologic blockage of N-cadherin by a single injection of a blocking antibody into the CSF of chick embryos results in areas devoid of ependyma and the progressive formation of ependymal rosettes in the underlying neuropil (22); suggesting that both phenomena are related and that rosettes may be the result of a primary defect of the developing ependyma leading to its abnormal migration into the neuropil. Interestingly, ependymal denudation coexisting with subependymal rosettes is found in hydrocephalic human fetuses (2; present report). The fact that there is a differential expression of GFAP and vimentin in the ependymal cells lining the ventricular surface as compared to that of the cells forming the rosettes indicates that the latter not only results from an abnormal migration but also from a change in the phenotype. This could also explain the appearance of subependymal ependymal clusters. Sarnat has shown that in fetuses and infants with Chiari II malformations and stenosis of the cerebral aqueduct there are vimentin-immunoreactive subependymal rosettes in the vicinity of the fourth ventricle, and vimentin is focally upregulated in the ependyma of the areas of dysgenesis, namely the aqueduct, fourth ventricle, and central canal of the spinal cord, but not in the ependyma of lateral ventricles (23). These observations could not be confirmed in the present investigation since it could not be established whether the 3 cases of hydrocephalus associated with lumbosacral meningocele studied were compatible with a Chiari II malformation. Furthermore, the ependyma of the cerebral aqueduct and lateral ventricle of these cases appears to express vimentin normally.

Different genetic defects affecting the ependyma appear as a primary alteration leading to hydrocephalus (5, 6). The present findings in human fetuses with a communicating hydrocephalus, especially those obtained in early developmental stages when hydrocephalus is moderate, favor the view that in the human also an alteration in the ependyma could precede the onset of hydrocephalus.

The fact that a primary defect in the ependyma of a given animal mutant triggers hydrocephalus can be explained on the basis of a gene mutation (see above). However, an explanation (on a genetic basis) of the ependymal denudation as a primary defect in the 8 human fetuses studied, whose hydrocephalus could be expected to be of different etiologies, is more difficult. The possibility that in many or most cases of human fetal hydro-

cephalus there is a common defect at the ependymal cell lineage leading to ependymal detachment has to be considered. This possibility is supported by the fact that in the four known hydrocephalic mutant and transgenic mice displaying mutations of different genes, they all shared a primary defect of the ependymal lining (3–7, 24, 25).

Reaction of Astroglia and Microglia to Ependymal Detachment

It has been established that astrocytes play a key role in repairing the denuded areas in hydrocephalic *hyh* mice (4). Indeed, they proliferate, migrate to the denuded walls, change their phenotype (they express vimentin normally expressed only by the ependyma), and form a lining “resembling” the ependymal layer. Furthermore, a period of a few days elapsed between the ependymal detachment and the astroglial lining of the exposed surface (4). This might explain the fact that in the youngest hydrocephalic human fetuses the denuded area lacked astrocytes and in older fetuses such areas were occupied by GFAP-positive astrocytes. It may be suggested that in the hydrocephalic human fetuses a process to repair the denuded areas takes place during the fetal life.

The increased number of microglia/macrophage cells in the neuropil of the denuded areas was a phenomenon observed in the oldest fetuses studied. Although the functional significance of this finding is difficult to envisage, the following information is worth considering. Microglial cells, in addition to being phagocytic, have multiple functions, (26). Thus, they have been shown to regulate astrogliosis in scar formation (27), and in mutant hydrocephalic H-Tx rat they upregulate as soon as there is ventricular enlargement (28).

Detachment of the Ependymal Layer May Affect the Process of Neurogenesis in Hydrocephalic Fetuses

Most of the cells of the developing mammalian brain are produced in 2 germinal zones associated with the ventricular walls, namely, the ventricular zone and the subventricular zone. The ventricular zone is a pseudostratified ependyma containing multipotent neural stem cells. As the brain develops, this zone progressively transforms into immature and then into mature ependyma. The subventricular zone is located underneath the ventricular zone along the lateral walls of the lateral ventricles of the embryonic brain (29). Neurogenesis continues in this zone throughout the animal life span (30). In rodents and primates the postnatal subventricular zone contains the primary (stem cells) and secondary (neuroblasts) progenitors; young neurons born in this region migrate in chains to replace neurons of the olfactory bulb (30, 31). In the adult human, however, the subventricular zone is a niche of unique organization where astrocytes forming a subependymal ribbon behave as multipotent progenitor cells and migrating neuroblasts are missing (32). According to the present findings, the subventricular zone of the oldest human fetuses studied (36 and 40 weeks) is a distinct zone occupied by astrocytes and neuroblasts, thus resembling that of rodents (30) and primates (31). Although more evidence is needed to confirm the presence in the human fetal brain of a “conventional” subventricular zone, the question arises of how and when the

shift from the conventional fetal to the unique postnatal subventricular zone does occur.

Detachment of the ependyma of the lateral ventricles of the hydrocephalic fetuses results in (i) the loss of the germinal ependymal zone, (ii) the disorganization of the subventricular zone, and (iii) the abnormal migration of neuroblasts into the ventricular cavity. Thus, detachment of the ependymal layer in hydrocephalic fetuses would not only be associated with the pathogenesis of hydrocephalus (see above) but also to abnormal neurogenesis. Interestingly, widespread loss and disorganization of ependyma is found in the brain of children with lissencephaly and other disorders of neuroblast migration (33).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Sebastian Luna-More, head of the Department of Pathology of Hospital Materno Infantil Carlos Haya, Malaga, Spain, for providing most of the tissue samples used in the present investigation; Mr. Genaro Alvia from Instituto de Histología y Patología, Valdivia, Chile; and personnel of Department of Pathology of Hospital Materno Infantil Carlos Haya for valuable technical support.

REFERENCES

- Page RB, Leure-duPre AE. Ependymal alterations in hydrocephalus. In: Wood JH, ed. *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid*. New York: Plenum Press, 1983;789–820
- Sarnat HB. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:1–15
- Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, et al. A programmed ependymal denudation occurring during the embryonic life precedes the development of congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1105–19
- Wagner C, Bätz F, Rodríguez S, et al. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of *hyh* mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1019–40
- Davy BE, Robinson ML. Congenital hydrocephalus in *hy3* mice is caused by a frameshift mutation in *Hydin*, a large novel gene. *Hum Mol Genet* 2003;12:1163–70
- Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, et al. RNA-binding protein Musashi family: Roles of CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *P Natl Acad Sci USA* 2002;99:15194–99
- Blackshear PJ, Graves JP, Stumpo DJ, Cobos I, Rubenstein JLR, Zeldin DC. Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development* 2003;130:4539–52
- Rodríguez EM, Rodríguez S, Hein S. The subcommissural organ. *Micr Res Tech* 1998;41:98–123
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18:315–33
- Choy YL, Chi JG, Suh YL. CD99 immunoreactivity in ependymoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:125–29
- Sarnat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatric Neurol* 1992;8:163–78
- Sarnat HB. Regional differentiation of the human fetal ependyma: Immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:58–75
- Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: A review. *Microsc Res Techniq* 1998;41:2–13
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 2001;11:406–12
- Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: Crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 2003;83:871–932
- Peruzzo B, Pastor FE, Blázquez JL, Amat P, Rodríguez EM. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanyocytes of the rat. *Cell Tissue Res* 2004;317:147–64
- Sarnat HB. Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc Res Tech* 1998;41:14–28
- Dooling EC, Chi JG, Gilles FH. Ependymal changes in the human fetal brain. *Ann Neurol* 1977;1:535–41
- Chae TA, Kim S, Marz KE, Hanson PI, Walsh CA. The *hyh* mutation uncovers roles for α Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 2004;36:264–70
- Hong HK, Chakravarti A, Takahashi S. The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein α is mutated in hydrocephaly with hop gait (*hyh*) mice. *P Natl Acad Sci USA* 2004;101:1748–53
- Bajjalieh S. Trafficking in cell fate. *Nat Genet* 2004;36:216–17
- Gänzler-Odenthal SI, Redies C. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci* 1998;18:5415–25
- Sarnat HB. Regional ependymal upregulation of vimentin in Chiari II malformation, aqueductal stenosis, and hydromyelia. *Pediatr Devel Pathol* 2004;7:48–60
- Pérez-Figares JM, Jiménez AJ, Pérez-Martín M, et al. Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:188–202
- Pérez-Figares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 2001;52:591–607
- Spranger M, Fontana A. Activation of microglia: A dangerous interlude in immune function in the brain. *Neuroscientist* 1996;2:293–99
- Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 1985;228:497–99
- Mangano FT, McAllister JP, Jones HC, Johnson MJ, Kriebel RM. The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res* 1998;20:697–704
- Wichterle H, García-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 1999;128:3759–71
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002;22:629–34
- Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *P Natl Acad Sci USA* 2001;98:4752–57
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brains contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;427:740–44
- Sarnat HB, Darwish HZ, Barth PG, et al. Ependymal abnormalities in Lissencephaly/Pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:525–41

Investigación y Avances en Medicina Neonatal

J. López Sastre
J. M.^a Fraga Bermúdez
G. D. Coto Cotallo
B. Fernández Colomer

Publicaciones y
Divulgación Científica

U
ma
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

"ENCEFALOPATIA HIPOXICO-ISQUÉMICA"	
<i>R. Jiménez</i>	9
REANIMACIÓN EN LA SALA DE PARTOS: POSIBLE TOXICIDAD DEL OXÍGENO	
<i>M. Vento Torres</i>	19
DAÑO CEREBRAL NEONATAL EN RECIEN NACIDOS DE TÉRMINO. ASFIXIA, PARALISIS CEREBRAL, Y RESONANCIA MAGNETICA	
<i>A. Sola</i>	25
NEUROIMAGEN EN LA ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA. MONITORIZACIÓN NO INVASIVA DE LA HEMODINÁMICA CEREBRAL	
<i>F. Cabañas</i>	33
ACTUALIZACION SOBRE ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCION	
<i>JA. Martínez Orgado, D. Fernández López, B. Bonet Serra, I. Lizasoain</i>	45
FACTORES DE RIESGO Y PRONÓSTICO DE LA ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA	
<i>L. Flores-Sarnat</i>	53
CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICAS DEL FALLO RESPIRATORIO HIPOXÉMICO	
<i>J. Quero, M.ª D. Elorza, J. Pérez Rodríguez</i>	67
EJES Y GRADIENTES DEL TUBO NEURAL EN EL DESARROLLO NORMAL Y EN LAS MALFORMACIONES DEL SNC	
<i>H. B. Sarnat,</i>	77
ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DEL PROCESO DE ESTENOSIS DEL ACUEDUCTO DE SILVIO QUE CONDUCE AL DESARROLLO DE HIDROCEFALIA HEREDITARIA	
<i>E. M. Rodríguez, C. Wagner, F. Bátiz, S. Rodríguez, K. Vio, A. J. Jiménez, M.D. Domínguez, J. M. Pérez-Fígares</i>	85
"MECANISMOS DE INJURIA Y POSIBLE PROTECCIÓN DEL CEREBRO EN DESARROLLO"	
<i>M. Rogido</i>	109
LA ZONA LIMÍTROFE DEL TALLO CEREBRAL E INFARTOS DEL TALLO FETAL Y NEONATAL	
<i>H. B. Sarnat,</i>	121
RETINOPATÍA DE LA PREMATURIDAD Y OXIGENOTERAPIA: UNA RELACIÓN CAMBIANTE	
<i>A. Sola, L. Chow, M. Rogido</i>	131
DIFERENTES PATRONES DE ABSORCIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO SEGÚN SUS FUENTES	
<i>M. Moya, M. Juste, E. Cortés, J. Pastor</i>	163

ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DEL PROCESO DE ESTENOSIS DEL ACUEDUCTO DE SILVIO QUE CONDUCE AL DESARROLLO DE HIDROCEFALIA HEREDITARIA

E. M. Rodríguez

C. Wagner

F. Bátiz

S. Rodríguez

K. Vío

Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

A. J. Jiménez

M. D. Domínguez

J. M. Pérez-Fígares

Departamento de Biología Celular, Universidad de Málaga, Málaga, España.

La hidrocefalia es la acumulación progresiva de líquido cefaloraquídeo (LCR) en el sistema ventricular, y ocurre principalmente durante la etapa perinatal. Los datos de su incidencia varían entre 0,11 y 3,5 por cada 1000 nacidos vivos (Bruni y col., 1988). La tasa de mortalidad es aproximadamente el 50% en los pacientes no tratados (Hope-Hirsch y col., 1998).

Existen varias formas de clasificar la hidrocefalia. Sin embargo, a la luz de los hallazgos de años recientes, la clasificación más simple y más cercana al fenómeno patológico es la que considera dos tipos de hidrocefalia, la hereditaria y la adquirida. La hidrocefalia hereditaria se debe a la mutación de un determinado gen en un grupo familiar humano o en una cepa animal. Se han indentificado varios genes cuya mutación resulta en hidrocefalia. Esta forma de hidrocefalia se empieza a expresar durante la vida embrionaria y por

lo tanto es una enfermedad congénita. La hidrocefalia adquirida puede iniciarse tanto en la etapa embrionaria, por enfermedades virales o nutricionales de la madre y ser, por la tanto, también una hidrocefalia congénita, como en la etapa postnatal. En este último caso, las causas son múltiples. El término de hidrocefalia congénita incluye, pues, formas hereditarias y formas adquiridas en útero, de la enfermedad. Ello implica colocar bajo una misma denominación procesos de naturalezas muy distintas. Sin embargo, en el humano, sólo se puede hablar de hidrocefalia congénita dado que en la mayoría de los casos no se establece si es o no por mutación genética. En los modelos animales es posible hacer esta distinción.

En la hidrocefalia congénita, la estenosis/obliteración del acueducto de Silvio (AS) aparece como el evento central del proceso fisiopatológico. En el 70% de los casos de hidrocefalia congénita humana hay estenosis/obliteración del AS (Haverkamp y col., 1999). Aunque se ha planteado la posibilidad que la estenosis del AS sea la consecuencia de la hidrocefalia (Williams, 1973; Borit, 1976), la mayoría de las investigaciones indican que la estenosis del AS es un evento clave en el desarrollo de la hidrocefalia congénita (Borit, 1976; Jones y col., 1987; Jones y Bucknall, 1988; Bruni y col., 1988).

La estenosis/obliteración del AS parece ser un fenómeno multietiológico, como factores virales, nutricionales y genéticos. Puede resultar de una infección viral subclínica de mujeres embarazadas (Margolis y Killham, 1969; McComb, 1997; Herndon y col., 1974; Takeuchi y Takeuchi, 1986) y de desórdenes nutricionales, principalmente hipovitaminosis B₁₂ y deficiencias en ácido fólico de la madre (Overholser y col., 1954; Newberne, 1962). Trabajos recientes reflejan la importancia relativa de las hidrocefalias hereditarias dentro de las hidrocefalias fetales humanas (Schrandt-Stumpel y Fryns 1998; Haverkamp y col., 1999); sin embargo, sólo una de ellas (mutación L1) ha sido caracterizada satisfactoriamente (Weller y Gärtner 2001), dejando un gran porcentaje de hidrocefalias congénitas en las que no se identifica su etiología. Se sugiere que la mayor parte de estas hidrocefalias idiopáticas se debería a alteraciones genéticas todavía no identificadas (Haverkamp y col., 1999). La mutación del gen que codifica para la molécula de adhesión celular L1 CAM conduce, por mecanismos desconocidos, a la estenosis acueductal en el hombre y en el ratón, y a la consecuente hidrocefalia (Wong y col., 1995; Dahme y col., 1997; Fransen y col., 1998). Todos estos hallazgos aportan a la identificación de agentes o compuestos que podrían estar involucrados en el mecanismo de la estenosis acueductal, pero no dan luces acerca del mecanismo propiamente tal. Evidencias recientes obtenidas en diferentes modelos animales de hidrocefalia hereditaria indican la presencia de alteraciones neuropatológicas en las paredes ventriculares (epéndimo) antes de la estenosis/obliteración acueductal, e incluso antes que se produzcan las ventriculomegalias (Nojima y col., 1998; Jiménez y col., 2001; Tullio y col., 2001; Sakakibara y col., 2002; Blackshear y col., 2003; Davy y Robinson 2003; Fernández-Llebrez y col., 2004). Estos hallazgos han revolucionado la concepción mecánica tradicional de la hidrocefalia, y ha comenzado a emerger una concepción más orientada hacia la patología celular y molecular.

Hidrocefalia: ¿una patología endimaria?

Numerosos autores han relacionado diferentes alteraciones endimarias e incluso la pérdida de células endimarias (denudamiento) con el proceso hidrocefálico (Page y Leure-duPree 1983; Sarnat 1995; 1998). En la mayoría de estos casos, y a pesar de no haberse identificado las causas, estas alteraciones han sido consideradas como resultantes del aumento de la presión del LCR y de la dilatación ventricular (Page y Leure-duPree 1983; Sarnat 1995). En este contexto, Sarnat (1992), considera que la severidad de las alteraciones endimarias y/o la extensión del denudamiento endimario se correlacionan con la severidad de la dilatación ventricular, y concluye que las alteraciones endimarias no serían primarias en la patogenia del proceso hidrocefálico.

Sin embargo, hallazgos recientes han provisto fuertes evidencias que indican que las alteraciones endimarias no serían consecuencia de las ventriculomegalias, sino que la hidrocefalia se originaría a partir de una alteración primaria en las células del linaje endimario (Pérez-Fígares y col., 1998; Nojima y col., 1998; Jiménez y col., 2001; Blackshear y col., 2003; Davy y Robinson 2003; Wagner y col., 2003).

Existen varios tipos y subtipos de células endimarias (Wagner y col., 2003), entre los que podemos destacar (i) células endimarias comunes multiciliadas que tapizan las cavidades de todo el sistema ventricular y el canal central de la médula espinal, y (ii) células endimarias secretorias, como las células endimarias que conforman el órgano subcomisural (OSC). Hay fuertes evidencias que indican que alteraciones primarias de ambos linajes de células endimarias conducen al desarrollo de hidrocefalia (Fig. 1).

Una alteración primaria de las células endimarias ciliadas precede y probablemente gatilla el desarrollo de hidrocefalia

Existen varios modelos animales de hidrocefalia hereditaria, y aunque difieren en los genes mutados, muchos de estos modelos presentan una alteración temprana de las células del linaje endimario. En este contexto, el ratón *hyh* (Bronson y Lane 1990), es uno de los pocos modelos en los que hemos estudiado exhaustivamente las alteraciones que ocurren en el embrión hidrocefálico.

La hidrocefalia congénita en el mutante *hyh* se desarrolla en dos etapas. (i) La etapa prenatal en que a partir de E12 se produce un denudamiento programado del epéndimo ventral que precede el inicio en E15 de una hidrocefalia moderada comunicante cuya causa probable sea un aumento del flujo en masa de líquido intersticial del tejido cerebral, producto de la ausencia de epéndimo ventral (Fig. 2) (Jiménez y col., 2001). (ii) La etapa postnatal comienza con el denudamiento del epéndimo dorsal del AS en los primeros días postnatales, lo que conduce a la fusión de las neurópilas denudadas, a la consecuente obli-

teración del AS y al desarrollo de una hidrocefalia severa (Wagner y col., 2003) y finalmente a la muerte (Figs. 2-4). En la cepa mutante *hyh*, la hidrocefalia comunicante y la hidrocefalia obstructiva son parte de un mismo fenómeno fisiopatológico (Fig. 2). Estudios preliminares del seguimiento del desarrollo de hidrocefalia congénita humana, indican que en el hombre también se puede observar una fase embrionaria con un acueducto cerebral permeable, y una fase postnatal con un acueducto obliterado (observaciones no publicadas por los autores). De este modo, el esclarecimiento del mecanismo conducente a la obliteración acueductal en el ratón mutante *hyh* podría ayudar en la investigación de la estenosis acueductal que opera en la hidrocefalia congénita humana.

En resumen, la hidrocefalia moderada que ocurre en el embrión mutante *hyh* es precedida por el desprendimiento del epéndimo ventral, y la hidrocefalia grave postnatal es precedida por el denudamiento del epéndimo dorsal. Esto origina una pregunta clave: ¿cuál es el mecanismo celular y molecular responsable del denudamiento de las células endimarias?

En el AS existen varias poblaciones de células endimarias que están involucradas en distintos aspectos del proceso hidrocefálico

El estudio ultraestructural y el uso de algunos marcadores moleculares revelan la existencia de varias poblaciones de células endimarias distribuidas a través de las paredes del AS (Wagner y col., 2003). El significado funcional de esta diversidad de poblaciones endimarias es completamente desconocido. Sin embargo, el significado patológico de estas poblaciones endimarias del AS en la hidrocefalia que desarrolla el mutante *hyh* es evidente. Tres procesos completamente diferentes ocurren a través del AS de estos ratones; una marcada estenosis de su extremo rostral, una gran dilatación de su región media y la obliteración de su extremo caudal (Figs. 3A, B). El extremo rostral marcadamente estenosado del acueducto está cubierto dorsalmente por el OSC y ventralmente por un epéndimo cúbico ciliado; ninguno de estos epéndimos se denuda (Fig. 3). Por otro lado el epéndimo que recubre las paredes dorsal y ventral del extremo caudal del AS, se desprende de un modo secuencial llevando a una fusión de ambas neurópilas y a una completa obliteración de esta región discreta del AS (Figs. 4A-E). En cambio, el epéndimo del receso colicular (región media dorsal del AS) no sólo no se desprende, sino que prolifera, permitiendo la gran expansión de esta cavidad (Fig. 3B). Estas evidencias apoyan la existencia de linajes endimarios diferentes en el AS.

Probable mecanismo(s) del denudamiento endimario

Trastorno en la sialilación de las glicoproteínas

En el ratón *hyh* hidrocefálico, a partir de E-17 hay numerosos macrófagos que cubren el piso denudado del acueducto y cuarto ventrículo. Después del parto su densidad en las

áreas denudadas, aumenta (Figs. 5,6). La fuente de estos macrófagos ventriculares no está claramente establecida, pero hay evidencias de que ellos proliferan dentro de las cavidades ventriculares. Los macrófagos establecen una relación espacial estrecha con áreas denudadas y con regiones endimarias que van a denudarse (Figs.6, 7), pero están ausentes en aquellas regiones que nunca se denudan. Este hecho establece una relación directa entre el denudamiento endimario y los macrófagos.

¿Por qué en las regiones epéndimarias que aún no se han desprendido, pero que se van a denudar, los macrófagos establecen contacto sólo con las células endimarias más diferenciadas (epéndimo maduro multiciliado)? Podría postularse que un defecto sólo expresado en ciertos estadios de la diferenciación y/o maduración celular podría gatillar la interacción entre los macrófagos y las células endimarias. Los macrófagos presentan diversos tipos de receptores de membrana que los involucran en diferentes procesos. Hay evidencias de que los macrófagos ventriculares, a través de sus receptores complementarios tipo 3, están involucrados en endocitosis mediada por receptores, y a través de los antígenos MHC I y II en la respuesta inmune (Ling col., 1998; Lu y col., 1996). Por otro lado, los macrófagos tienen receptores específicos para galactosa (Kelm y Schauer, 1997), y a través de este mecanismo interaccionan con glicoproteínas de superficie desialiladas que exponen galactosa como residuo terminal (Kelm y Schauer, 1997; Bratosin y col., 1998). Proponemos la hipótesis que en el ratón *hyh* hidrocefálico, un defecto en la sialilación de las N-glicoproteínas, pudiera expresarse en ciertos estadios de la diferenciación o maduración endimaria, dando como resultado glicoproteínas de superficie con galactosa como residuo de azúcar terminal. Esta posibilidad se apoya en los presentes hallazgos: (i) La existencia en los ratones *hyh* de células endimarias con un glicocáliz que une la lectina PNA que tiene afinidad sólo por residuos de galactosa terminal (Fig. 8) (Herrera y Rodríguez, 1990). (ii) La presencia de macrófagos intraventriculares en estrecho contacto con células endimarias intactas que van a denudarse (Fig. 6), con células endimarias aún parcialmente adosadas a las paredes ventriculares (Figs. 7C, E, F) y con células endimarias libres en las cavidades ventriculares (Fig. 7G).

Siendo lo más probable que una alteración primaria de las células endimarias gatille una serie de eventos, entre ellos, su interacción con macrófagos, la evidencia obtenida sugiere que los macrófagos participan activamente en el proceso del denudamiento de las células endimarias patológicas, y no que sean agentes reactivos que sólo fagociten células ya desprendidas (Fig. 9B).

¿Cómo explicar que sólo ciertos linajes de células endimarias sean portadoras de un defecto en sus sialoglicoproteínas? Las células endimarias presentan un glicocáliz rico en ácido siálico formado, en parte, por sialoglicoproteínas de membrana. En los ratones *hyh* hidrocefálicos parece haber una alteración en la sialilación de las sialoglicoproteínas del glicocáliz (Fig. 8). Las enzimas responsables de la incorporación de ácido siálico terminal al árbol de oligosacáridos de las N-sialoglicoproteínas en el aparato de Golgi, son

las sialiltransferasas. En el hombre, hay al menos veinte diferentes enzimas sialiltransferasas, con cada una o un grupo de ellas expresadas en diferentes tejidos y en diferentes estadios del desarrollo (Harduin-Lepers y col., 2001). De este modo un defecto genético que afecte a una de ellas podría sólo alterar el tipo celular que exprese esta enzima o sólo durante el período del desarrollo en que se exprese. Existe una familia creciente de enfermedades hereditarias que se caracterizan por un desorden de la glicosilación de las N-glicoproteínas (Jaeken y Matthijs, 2001; Hanske y col., 2002) y que se denominan: CDG: *congenital disorders of glycosylation*. Estas enfermedades consisten en desórdenes que afectan el ensamblaje o el procesamiento de glicoproteínas, glicanos o glicoconjugados. El espectro clínico de los diferentes tipos de CDGs descubiertos es muy variable, pero muchos de ellos comparten el desarrollo de hidrocefalia (Marquardt y Denecke, 2003; Hanske y col., 2002). La investigación de las sialiltransferasas podría aclarar la posible implicancia de la ausencia de ácido siálico de las glicoproteínas del glicocálix endimario en el desarrollo de hidrocefalia congénita en la cepa *hyh*. Investigaciones en curso en nuestro laboratorio sugieren alteraciones en la expresión de dos sialiltransferasas en el tronco cerebral de los ratones *hyh*.

Si las células endimarias de los ratones *hyh* hidrocefálicos tienen un defecto en la N-glicosilación de sialoglicoproteínas, podría no sólo explicar la interacción de estas células con los macrófagos, sino también el defecto en la agregación de las sialoglicoproteínas de la FR secretadas por las células endimarias del OSC.

Trastorno en las proteínas de unión y de adhesión

Recientemente, dos grupos independientes llegaron a la conclusión que el gen mutado en la cepa *hyh* corresponde al gen Napa que codifica para la proteína α -SNAP (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha) (Chae y col., 2004; Hong y col., 2004). La proteína α -SNAP desempeña un papel clave en el transporte intercompartmental de proteínas (tráfico vesicular), incluyendo el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática. Aunque la proteína mutada parece mantener características físicas y bioquímicas similares a la proteína silvestre, la mutación provoca una reducción del 60% en la cantidad de proteína en extractos de cerebro total. Este fenómeno provoca una alteración en la localización de diferentes proteínas de superficie en las células precursoras neurales del neuroepitelio (Chae y col., 2004), y aunque no ha sido estudiado en profundidad, considerando los hallazgos de Jiménez y col. (2001) y Wagner y col. (2003), es muy probable que este defecto también se manifieste en las células del linaje endimario afectando las uniones intercelulares (Fig. 9A). Especial mención merece la principal proteína de los zónulas adherentes, N-cadherina.

N-cadherina se expresa ubicuamente en el neuroepitelio indiferenciado del SNC en desarrollo; sin embargo, a medida que avanza el desarrollo embrionario, la expresión se restringe a las células endimarias que tapizan el sistema ventricular y a los plexos coroi-

deos (Lagunowich y col., 1992). Al bloquear la función de N-cadherina durante el desarrollo cerebral temprano en pollos, mediante la inyección de anticuerpos anti-N-cadherina en el ventrículo tectal se observan alteraciones morfológicas masivas en diferentes áreas del cerebro. En un principio las alteraciones consisten en una desestructuración de la pared ventricular y la formación de rosetas neuroepiteliales; posteriormente, se observa una migración anómala de células hacia la cavidad ventricular. Estas evidencias llevaron a los autores a concluir que la función de N-cadherina es necesaria para el mantenimiento del neuroepitelio en regiones específicas del cerebro, y que la interrupción de ésta conduce a una neurogénesis y morfogénesis anormal (Gänzler-Odenthal y col., 1998). Interesantemente, alteraciones similares a estas (denudamiento endimario, formación de rosetas endimarias y migración celular anómala, en particular neuroblastos) se han descrito en diferentes casos de hidrocefalia humana (Fig.10) (Sarnat 1995; Domínguez-Pinos y col., 2004). Por otro lado, Lippoldt y col. (2000) demostraron que una reducción en la expresión de N-cadherina en las células endimarias, inducida por ésteres de forbol, producen un debilitamiento de las uniones intercelulares en la capa endimaria y un aumento del flujo en masa del tejido nervioso hacia los ventrículos.

Una alteración primaria de las células endimarias secretorias del órgano subcomisural puede gatillar el desarrollo de hidrocefalia

Overholser y col. (1954) han propuesto que las proteínas secretadas por el OSC al LCR durante la vida embrionaria previenen la obliteración del acueducto cerebral. Recientes informaciones sostienen este punto de vista. Las proteínas de la FR son N-sialoglicoproteínas (Nualart y col., 1991). En la FR, los residuos de ácido siálico están preferentemente dispuestos en la superficie de la fibra (Rodríguez y col., 1987, Fig.), lo que le confiere a esta estructura en continua agregación, una cubierta con carga negativa. Durante la primera semana postnatal en los ratones *hyh* normales, las glicoproteínas de la FR forman una lámina que cubre la mayor parte de la superficie ventral del ASC; esto podría dotar a esta región del acueducto con una carga negativa que contribuiría a la mantención de la comunicación de esta estrecha cavidad (Fig. 11).

Por otro lado, la OSC-espondina, la principal proteína constitutiva de la FR, tiene 26 *repeats* de tromboespondina tipo I, cada uno de los cuales contiene un microdominio de 4 amino ácidos (VTCTG) que tiene propiedades anti-adhesivas (Meinzel, 2001; Gobron y col., 1996; Monnerie y col., 1998). De este modo, la FR, una estructura en permanente crecimiento, que ocupa la mayor parte del lumen del extremo distal del AS, podría ser un elemento clave para la mantención del flujo del LCR a través del AS (Fig. 11). Consecuentemente, la ausencia de FR podría llevar a disturbios en la circulación del LCR (Cifuentes y col., 1994), estenosis acueductal e hidrocefalia (Vio y col., 2000). El ratón *hyh* hidrocefálico carece de la capacidad de formar la fibra de Reissner, y esta anomalía precede a la obliteración del extremo caudal del AS, lo cual indica que en este mutante la alteración del OSC precede la estenosis/obliteración del AS.

Una evidencia muy significativa respecto a la participación del OSC-FR en la patogé-
nia de la hidrocefalia es la obtenida a partir de la inmunoneutralización de las proteínas
secretorias del OSC mediante transferencia materna de anticuerpos en ratas (Rodríguez y
col., 1999; Vio y col., 2000); en estos animales se produce estenosis del AS y más tardia-
mente, hidrocefalia. Recientemente, se describió un ratón transgénico con una inserción
que impide la expresión de una variante del factor de transcripción *Rfx4* (miembro de la
familia de factores de transcripción *winged-helix*). Este ratón presenta agenesia del órgano
subcomisural e hidrocefalia congénita (Blackshear y col., 2003).

Otros experimentos han demostrado que ratones transgénicos que no expresan los
factores de transcripción de la familia homeobox *Pax6* y *Msx1*, presentan alteraciones en
el desarrollo de la comisura posterior y el OSC, y desarrollan hidrocefalia (Estivill-Torrús
y col., 2001; Fernández-Llebrez y col., 2004). Por otro lado, se ha descrito que los genes
que codifican para *Wnt-1* y engrailed (*En-1*) son importantes para la formación del OSC,
ya que la mutante *Wnt sw/sw* presenta malformación del OSC e hidrocefalia (Danielian y
McMahon 1996), y la expresión ectópica de *En-1* provoca hidrocefalia prenatal y ausencia
del OSC (Louvi y Wassef 2000).

Agradecimientos. Las presentes investigaciones han sido financiadas por proyectos
Fondecyt 1030265, Chile a EMR y FIS, PI 030756 de España a JMP-F.

Explicación de figuras

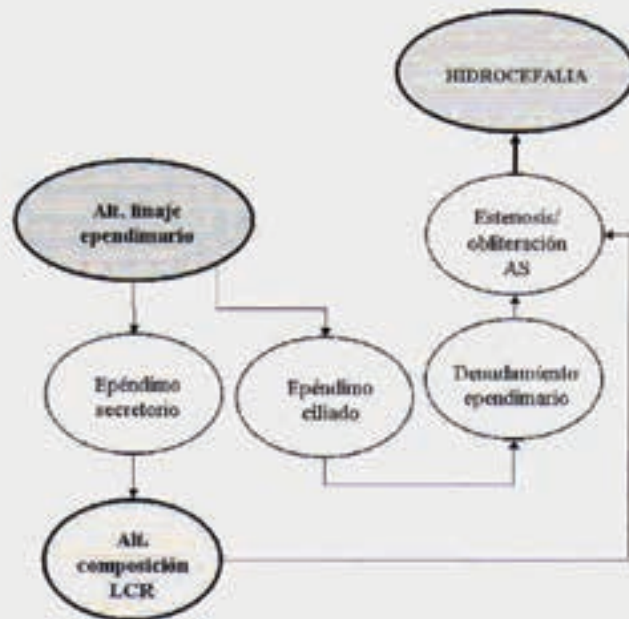


Fig. 1. Representación esquemática de la hipótesis que una alteración primaria del linaje de células ependimarias resulta en el desarrollo de hidrocefalia. La alteración del epéndimo secretorio (órgano subcomisural) conduce a una alteración del LCR y la del epéndimo ciliado a la estenosis/obliteración del acueducto de Silvio.

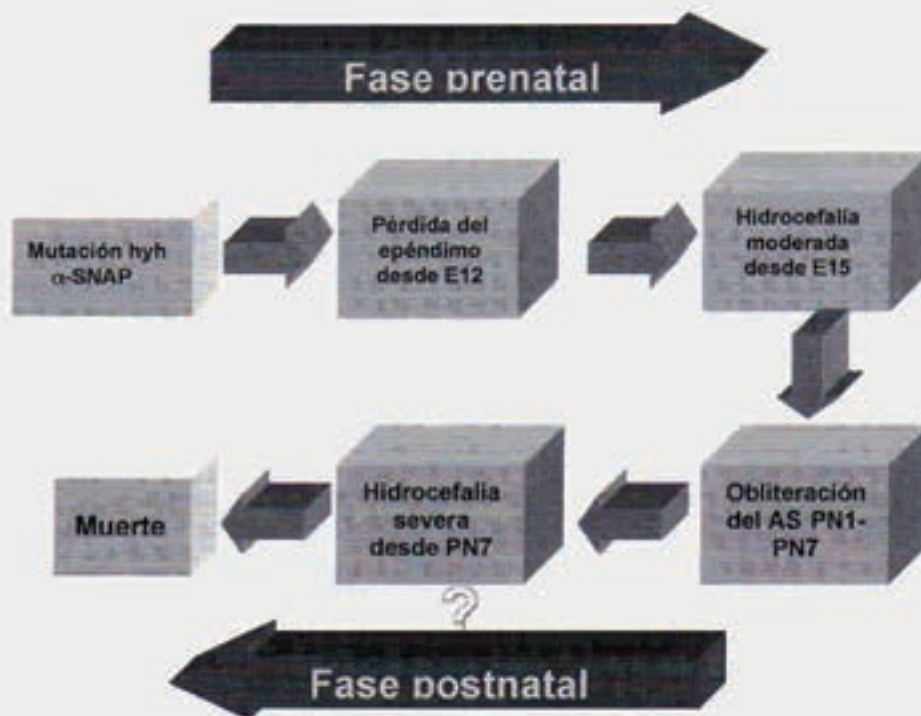


Fig. 2. Representación esquemática de los eventos secuenciales que ocurren pre- y postnatalmente en los ratones mutantes *hyh* que desarrollan hidrocefalia congénita. Los tres fenómenos claves son: 1) el desnudamiento ependimario programado, 2) la estenosis del extremo rostral del acueducto, ambos acontecimientos que ocurren en la fase embrionaria y que preceden al desarrollo de hidrocefalia moderada, y 3) la obliteración del extremo caudal del acueducto cerebral que ocurre durante la primera semana postnatal y que gatilla la hidrocefalia severa.

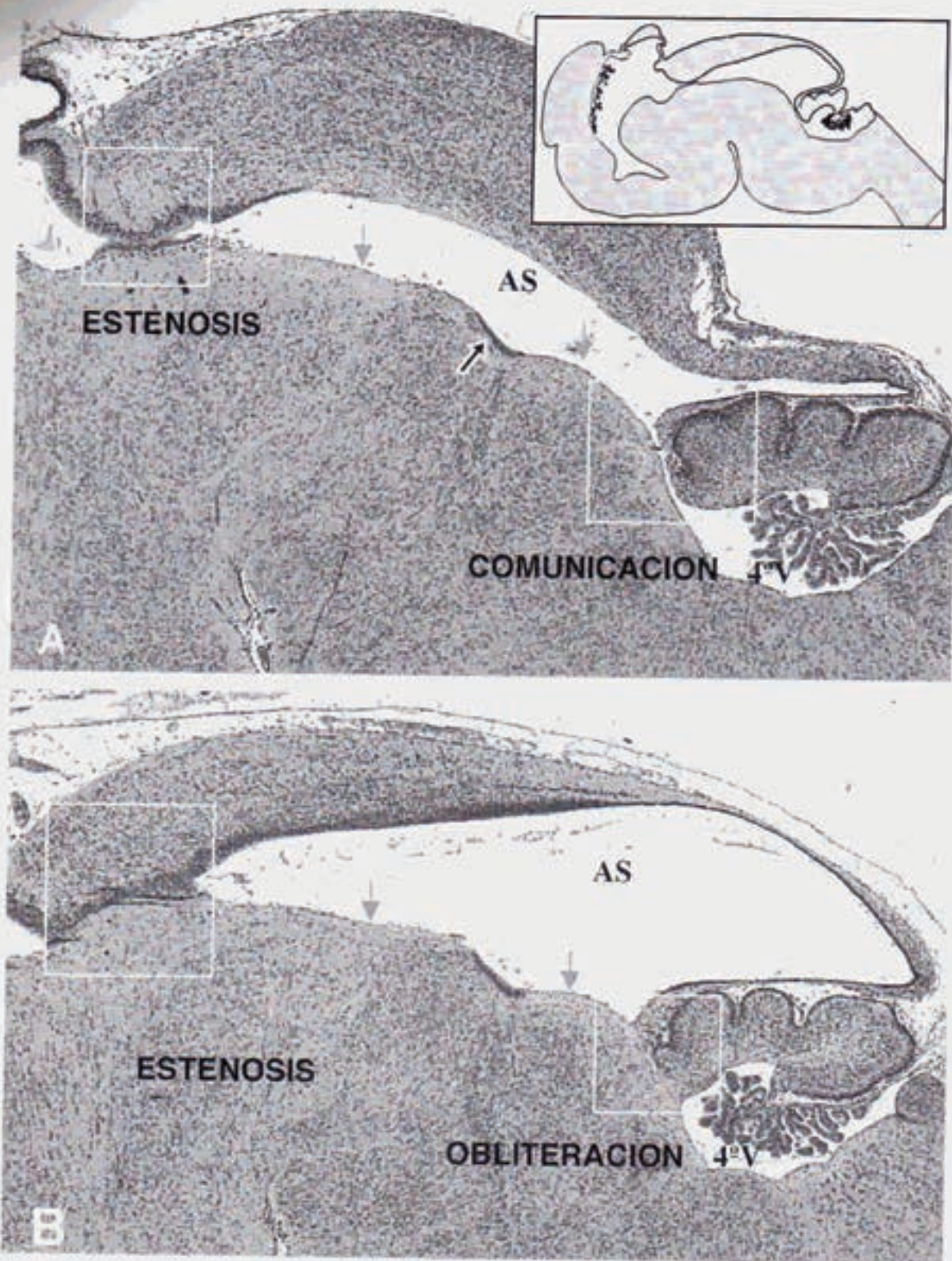


Fig. 3. Acueducto (AS) cerebral de dos ratones hermanos *hyh* hidrocefálicos de PN-4, teñidas con hematoxilina y eosina. **A:** Sección sagital del acueducto de un ratón *hyh* hidrocefálico aún comunicante (recuadro grande) y estenosis rostral (recuadro pequeño) del acueducto a nivel del órgano subcomisural. **B:** Sección sagital a través del acueducto de ratón *hyh* hidrocefálico de la misma camada que el anterior, con obliteración del extremo caudal del AS que presenta una mayor dilatación de la región media del AS que su hermano. **Abreviaciones:** flecha negra: epéndimo resistente al denudamiento; flechas rojas: piso del acueducto completamente denudado; 4ºV: cuarto ventrículo. A, B: 50x.

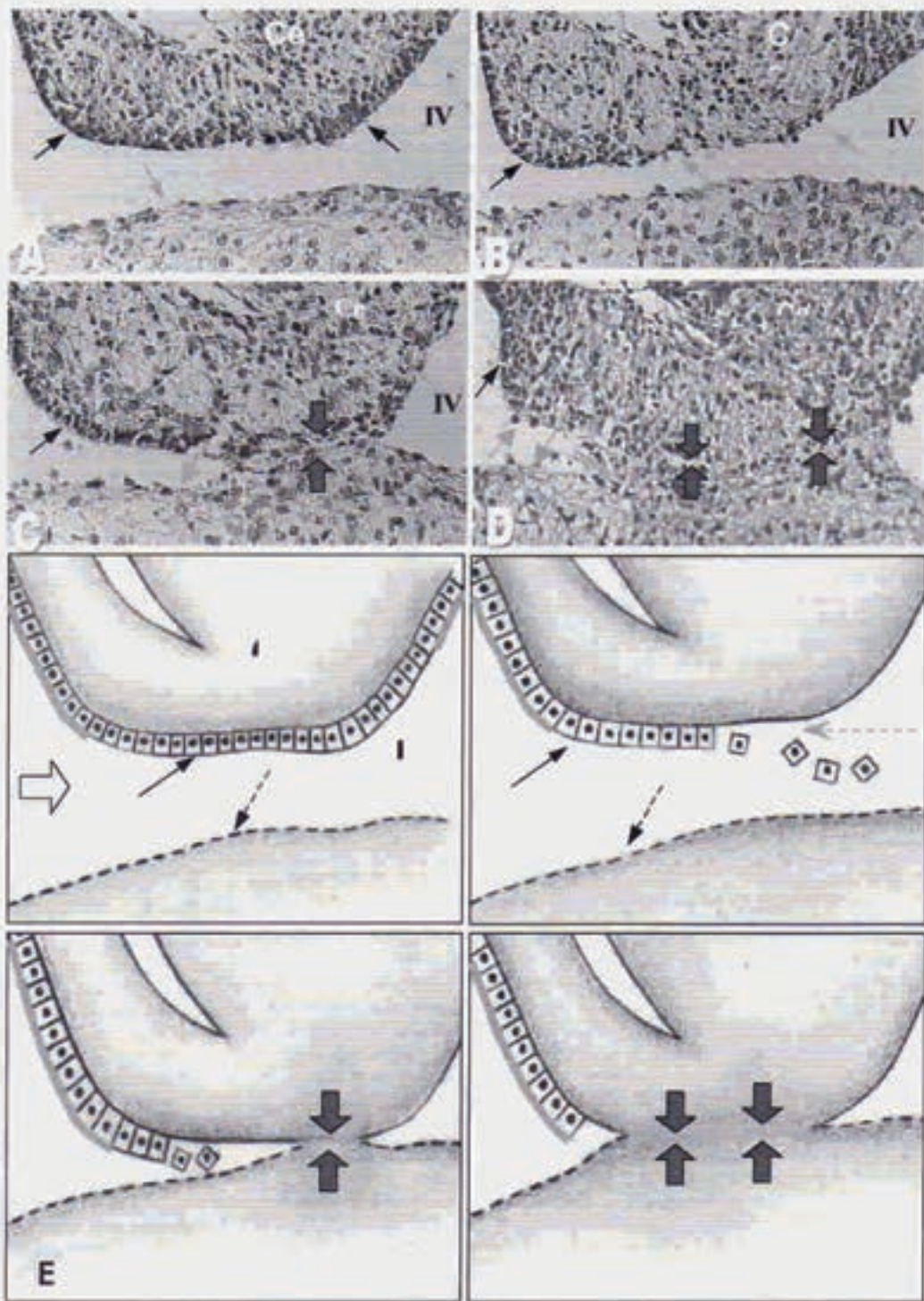


Fig. 4. A-D: Secciones sagitales a través del AS caudal de un embrión *hyh* hidrocefálico (E-19), teñido con hematoxilina y eosina. **A:** Sección sagital medial; el epéndimo dorsal está presente (flechas negras) y el epéndimo ventral está ausente (flecha roja). **B:** Sección sagital paramedial: zona caudal del epéndimo dorsal está ausente (flechas rojas). Flecha negra: epéndimo dorsal presente. **C:** Sección sagital en un plano más lateral que aquel de la figura anterior. Sólo las áreas denudadas opuestas llegan a fusionarse (flechas azules). Flecha negra, epéndimo dorsal intacto. **D:** Sección sagital de un plano más lateral que el de la figura anterior. Las neurópilas dorsal y ventral están completamente fusionadas (flechas azules). **E:** Dibujos en dos dimensiones ilustrando el proceso de denudamiento endimario (flecha roja) y la fusión de las neurópilas (flechas azules) que ocurre en el AS caudal del ratón *hyh* hidrocefálico. Flechas negras: epéndimo dorsal intacto; flechas rojas: superficie ventral denudada. La flecha amarilla indica la vista desde el AS medial. A-D: 325x

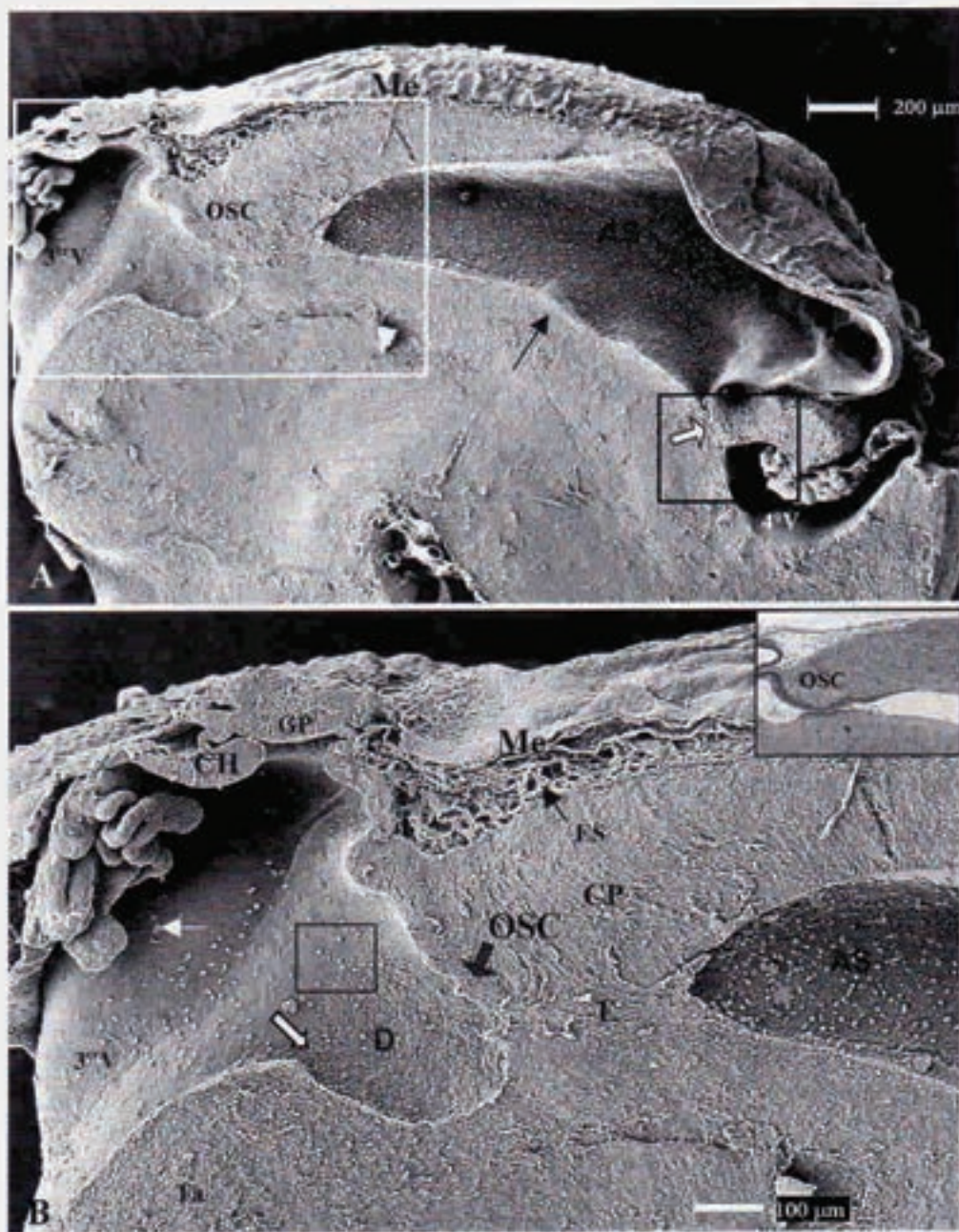


Fig. 5. A: Sección sagital medial a través del cerebro de un ratón *hyh* hidrocefálico de PN-2, procesado para microscopía electrónica de barrido. Se puede apreciar la dilatación del tercer ventrículo (3^oV), del acueducto cerebral (AS), la estenosis del AS rostral y la obliteración del AS caudal (flecha delineada en blanco). El piso y las paredes latero-ventrales del AS medio están completamente denudados. B: Detalle ampliado de la región del órgano subcomisural (OSC) mostrado en la figura 5A (recuadro blanco), mostrando (i) la región media del AS dilatada cuyas paredes denudadas están cubiertas de macrófagos, (ii) la marcada estenosis del extremo rostral del acueducto (E), (iii) un área del tercer ventrículo en proceso de denudamiento (D), y las paredes laterales de la mitad dorsal del tercer ventrículo (3^oV) tapizadas por un epéndima monociliado cubierto de numerosos macrófagos (flecha blanca). Se puede apreciar claramente el frente de avance del denudamiento (flecha blanca con borde negro). Sobre la comisura blanca posterior (CP) se observa el espacio subaracnoideo (ES) y las meninges (Me). **Recuadro:** Sección en parafina de un área similar a aquella mostrada en la figura anterior tomada con hematoxilina-eosina. **Abreviaciones:** 3^oV: tercer ventrículo; OSC: órgano subcomisural; AS: acueducto de Silvio; CH: comisura hebenular; Ta: tálamo; PC: plexos coroideos del tercer ventrículo. A: 50x; B: 100x.

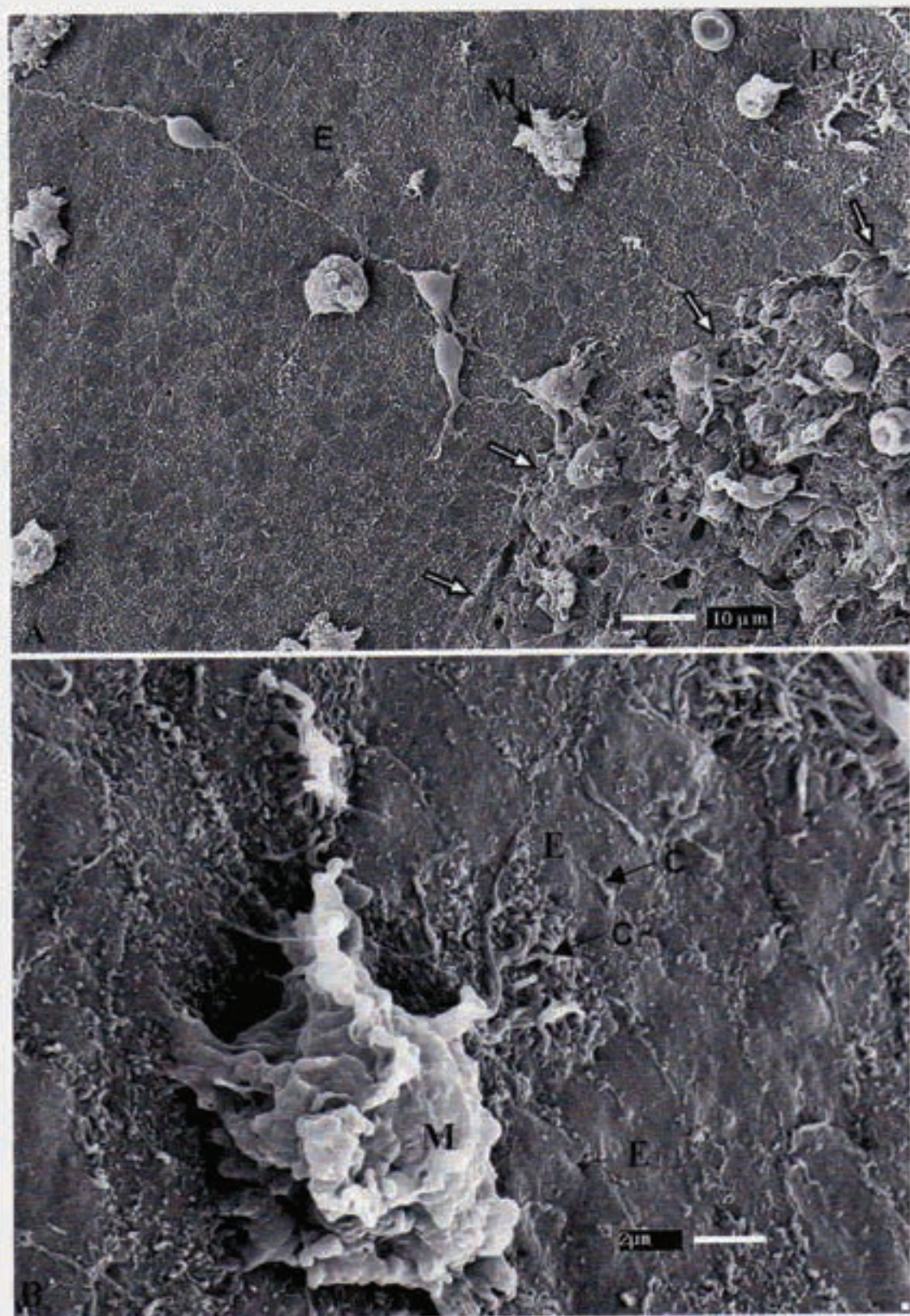


Fig. 6. A-B: Detalle ampliado a microscopía electrónica de barrido de un área enmarcada en la figura 5B, que corresponde a una zona de la pared latero-dorsal del tercer ventrículo de un ratón hidrocefálico, en proceso de denudamiento endimario. **A:** Nótese el frente de denudamiento (flechas blancas) y los macrófagos (M) sobre el epéndimo que va a denudarse. **B:** Amplificación del área no-denudada mostrada en la figura anterior revela el estrecho contacto de un macrófago (M) con dos células endimarias multiciladas vecinas (EC). **A:** 1.750x;

B: 10.400x.

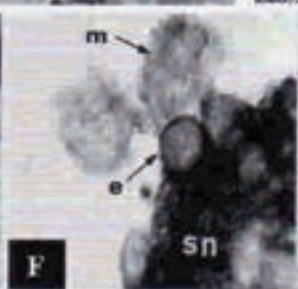
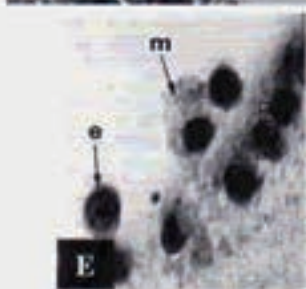
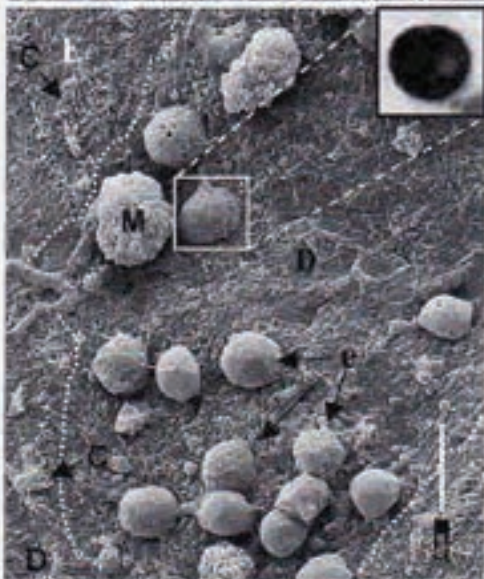
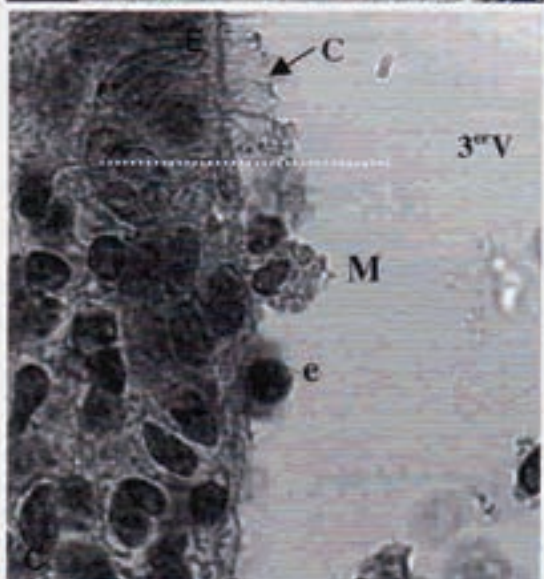
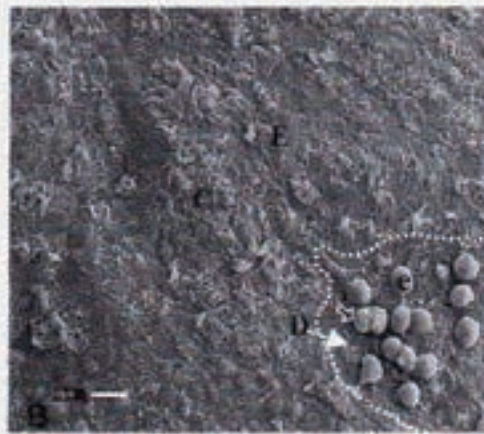


Fig. 7. A: Acueducto cerebral de un ratón *hyh* hidrocefálico de PN-3 procesado para microscopía electrónica de barrido; vista superior-lateral de una sección horizontal a nivel del acueducto de Silvio que descubre el piso denudado del acueducto cubierto de macrófagos (asterisco azul); la pared ventro-caudal conserva su cubierta de epéndimo monociliado (asterisco blanco) y la flecha negra muestra la obliteración caudal del acueducto. B: Detalle ampliado del recuadro de la figura anterior en que se aprecia una zona de denudamiento ependimario muy bien delimitada (límite marcado con línea punteada) por la cubierta de epéndimo monociliado (E) y multiciliado (C); sobre la zona denudada se pueden ver células esféricas de superficie lisa; la flecha negra apunta a una de estas células en contacto íntimo

con un macrófago; C: Detalle de límite de denudamiento ependimario (línea punteada) de la pared latero-ventral del tercer ventrículo de un ratón *hyh* hidrocefálico de PN-2 teñido con hematoxilina y eosina; por sobre el límite (línea punteada) puede apreciarse el epéndimo (E) multiciliado (C); por debajo del límite, la zona denudada (D) muestra en su superficie, un macrófago (M) cercano a unas células de núcleo esférico (e). D: Detalle ampliado de la zona delimitada por la línea punteada en la Fig. B; se puede apreciar la neurópila expuesta de la zona denudada (D) y sobre ella, células esféricas (e) y macrófagos (M) circundantes; *inserto*: célula esférica similar a las mostradas en las Figs. B y C, fuertemente vimentina positiva, probablemente correspondientes a células ependimarias desprendidas. E-G: Secciones de parafina a través de las paredes del acueducto de ratones hidrocefálico *hyh*. E: tinción de hematoxilina y eosina. F: Inmunotinción para N-CAM mostrando una fuerte reacción en la neurópila (sn) y en la pared de las células ependimarias que se llegarán a desprender (e), que están en estrecho contacto con macrófagos no-inmunorreactivos (m). G: Unión de la lectina del tomate LE. Células redondas con un glicocalix positivo, probablemente correspondiente a células ependimarias desprendidas, establecen estrecho contacto con macrófagos fuertemente marcados. *Abreviaciones*: E: epéndimo intacto; e: célula probablemente correspondiente a una célula ependimaria desprendida; m: macrófago; 4°V: cuarto ventrículo, 3°V: tercer ventrículo; C: epéndimo multiciliado. A: 66x; B: 750x; C: 1066x; E: 900x; F: 1100x; G: 1500x.

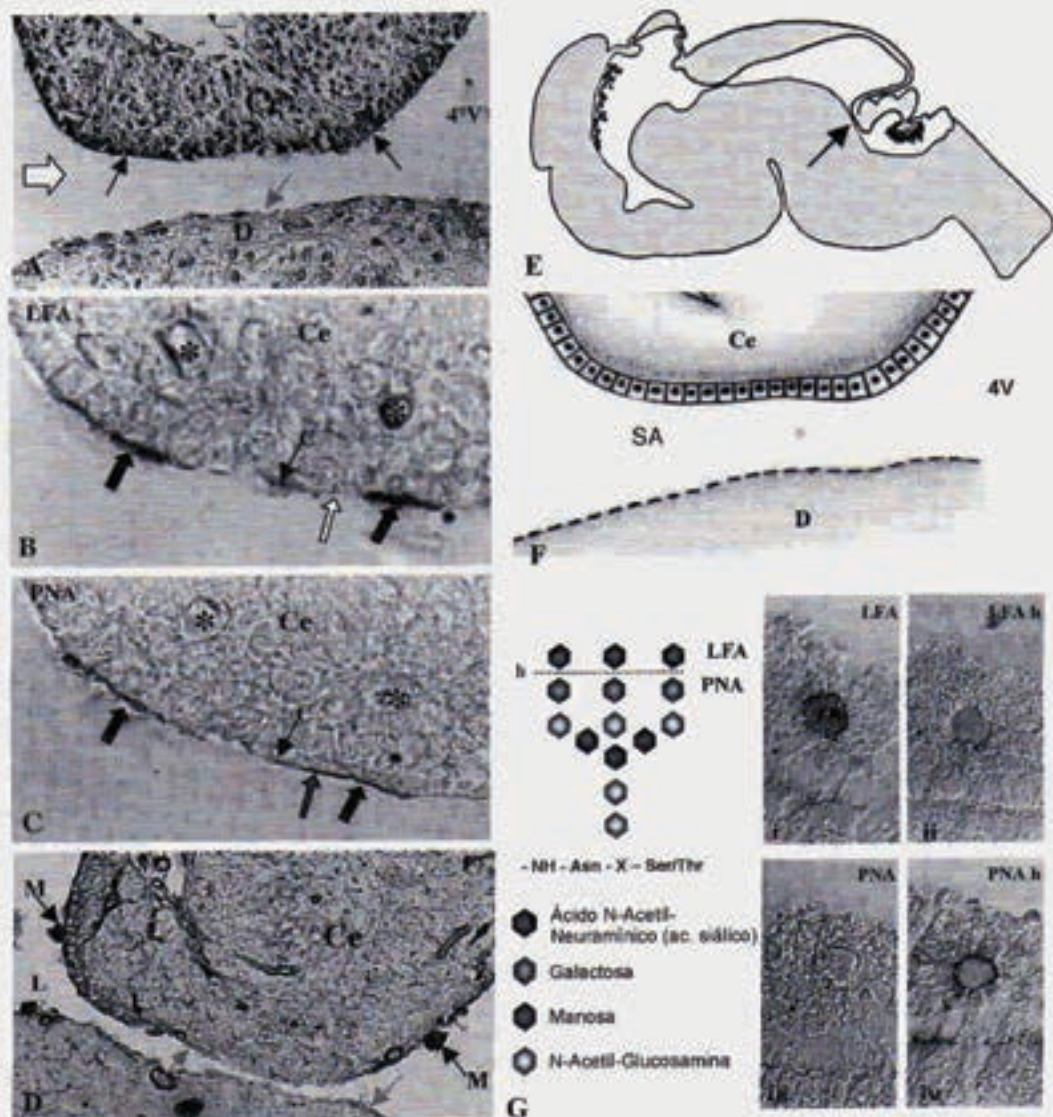


Fig. 8. Secciones sagitales a través de la región caudal del AS de embriones *hyh* hidrocefálicos (E-19). **A:** Sección sagital medial; el epéndimo fetal está presente (flechas negras) y el epéndimo ventral está ausente (flecha roja). **B y C:** Secciones vecinas adyacentes a la sección de la figura A, procesadas para unión de las lectinas LFA y PNA, respectivamente. Algunos grupos de células endimarias dorsales tienen un glicocáliz marcado por ambas lectinas (flechas negras gruesas), mientras que el de otros grupos de células está marcado con PNA (flecha azul), pero no con LFA (flecha blanca). **D:** Sección sagital del ASC teñida con lectina del tomate (LE) de un ratón *hyh* hidrocefálico de PN-2; el techo y el piso de esta región carecen de epéndimo (flechas rojas); nótese el estrecho contacto de los macrófagos (M) con el techo del AS denudado. **E:** Esquema que ilustra una vista sagital medial del cerebro de un ratón *hyh* hidrocefálico con hidrocefalia aún comunicante (flecha). **F:** Dibujo en dos dimensiones ilustrando el AS caudal que se muestra en la Fig. 15A; el piso del AS está denudado, mientras que el epéndimo dorsal permanece intacto. **G:** Representación del árbol de glicosilación de N-sialoglicoproteínas y el efecto de la pérdida de ácido siálico por la hidrólisis (h) sobre la unión de lectinas. La LFA se une a moléculas de ácido siálico terminal; la PNA se une a la galactosa terminal expuesta después de la hidrólisis (h). **i-iv:** Secciones transversales a través del canal central de la médula espinal de bovino procesadas para la unión de LFA y PNA (antes y después de la hidrólisis). Antes de la hidrólisis el glicocáliz del epéndimo y la fibra de Reissner (FR) son LFA+ y PNA-. Después de la hidrólisis ambas son LFA- y PNA+. **Abreviaciones:** flecha amarilla: vista desde el AS; Ce: cerebelo; 4°V: cuarto ventrículo; asteriscos: el mismo vaso sanguíneo que aparece en ambas secciones vecinas; C: célula endimaria multiciliada. A: 325x; B, C: 800x; D: 325x; H: 320x.

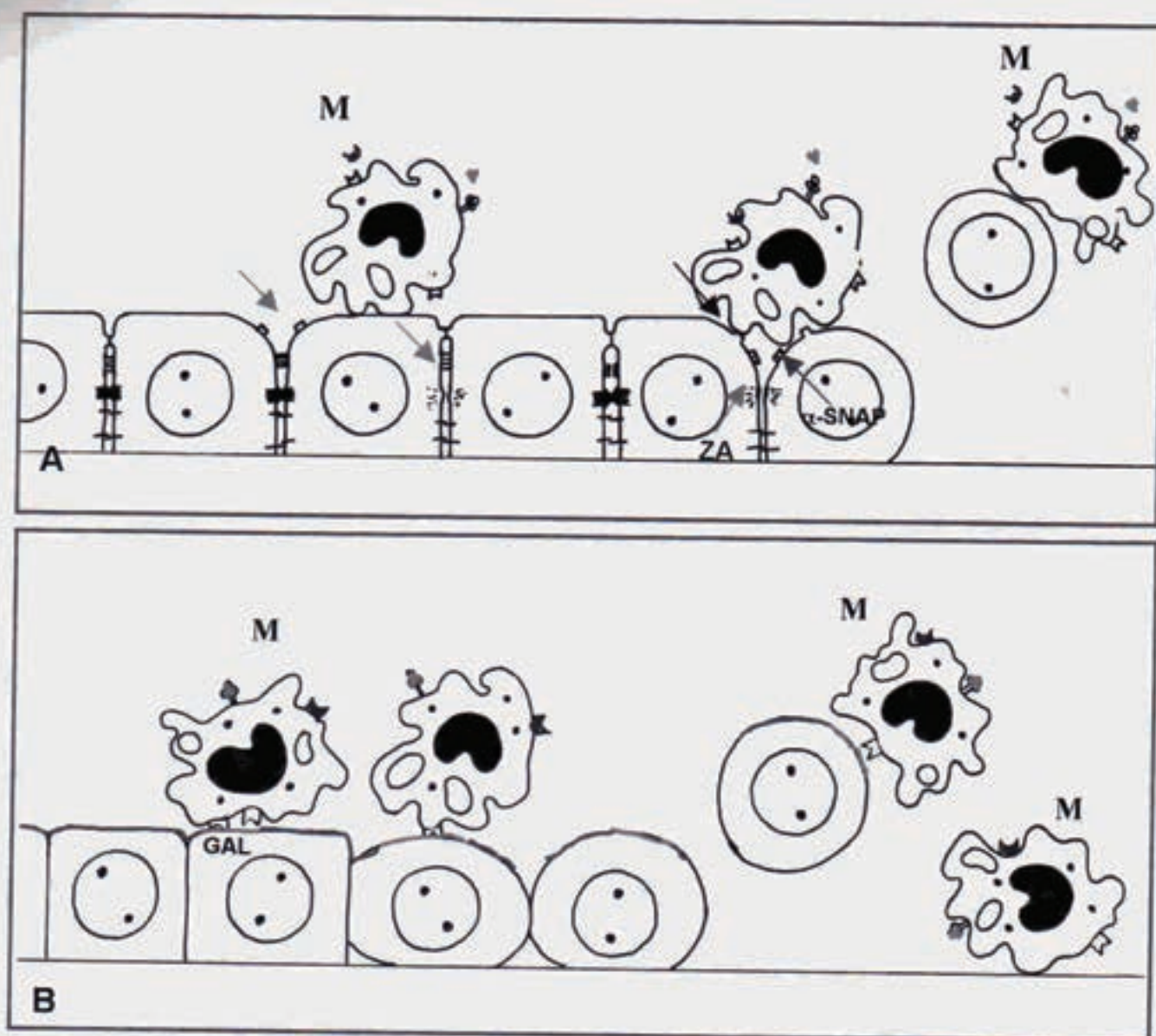


Fig. 9. A y B. Representación esquemática de las dos propuestas de posibles mecanismos involucrados en el denudamiento endimario que desencadena, tanto la hidrocefalia moderada inicial, como la hidrocefalia grave en el ratón mutante *hyh*. **A:** ilustración que representa algunos de los tipos de moléculas de adhesión celular o los complejos de unión celular que tienen las células endimarias normales y cómo éstas podrían estar alteradas (flechas rojas). La mutación del gen de α -SNAP resultaría en tráfico anómalo de proteínas a la membrana celular (flecha verde), entre ellas las proteínas de adhesión y de los medios de unión. Los macrófagos (M) siempre están presentes en contacto estrecho con las células endimarias durante las tres etapas del denudamiento endimario: i) epéndimo aparentemente normal; ii) epéndimo en proceso de denudamiento; y iii) células endimarias libres en la cavidad ventricular. **B:** Esquema que representa el glicocálix rico en ácido siálico (línea azul) de las células endimarias, y la exposición de los residuos de galactosa subterminal (línea roja) por ausencia del ácido siálico, producto de una posible alteración de alguna de las sialiltransferasas que transfiere este azúcar a las *N*-sialoglicoproteínas de la superficie celular. Los macrófagos (M) se unirían a las células que exponen galactosa en su superficie a través de sus receptores para galactosa (amarillo) y participarían activamente en el proceso de denudamiento endimario.

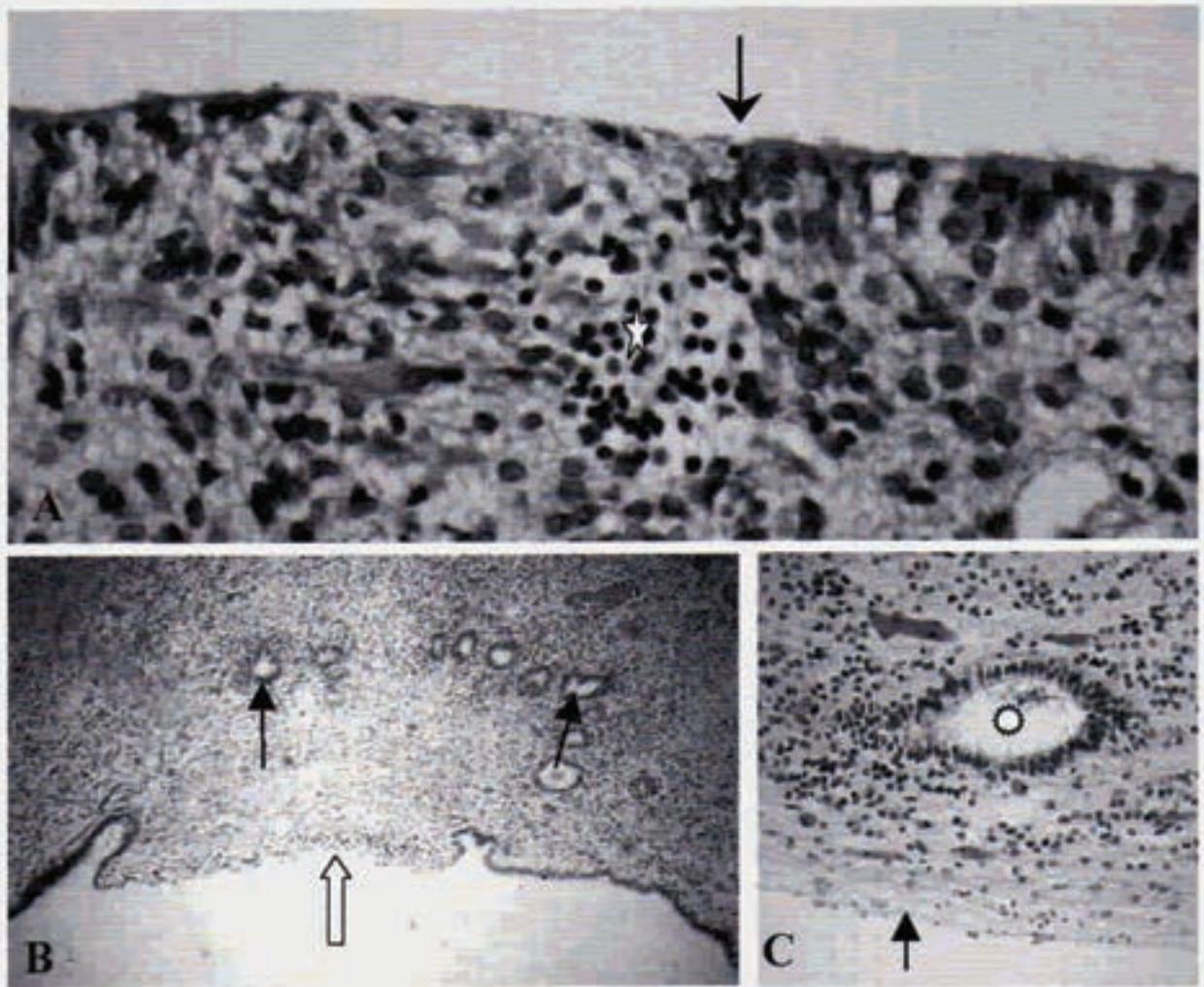


Fig. 10. Feto hidrocefálico humano de 30 semanas. Secciones a través de la pared del ventrículo lateral teñidas con hematoxilina-eosina. **A.** La flecha indica el límite entre una zona desnuda y una zona cubierta de epéndimo embrionario. Estrella: acúmulo anómalo de neuroblastos. **B.** Debajo de las zonas desnudas (perfil de flecha) se observan numerosas rosetas endimarias (flechas negras). **C.** Detalle de una roseta endimaria (estrella) ubicada debajo de una zona desnuda (flecha).

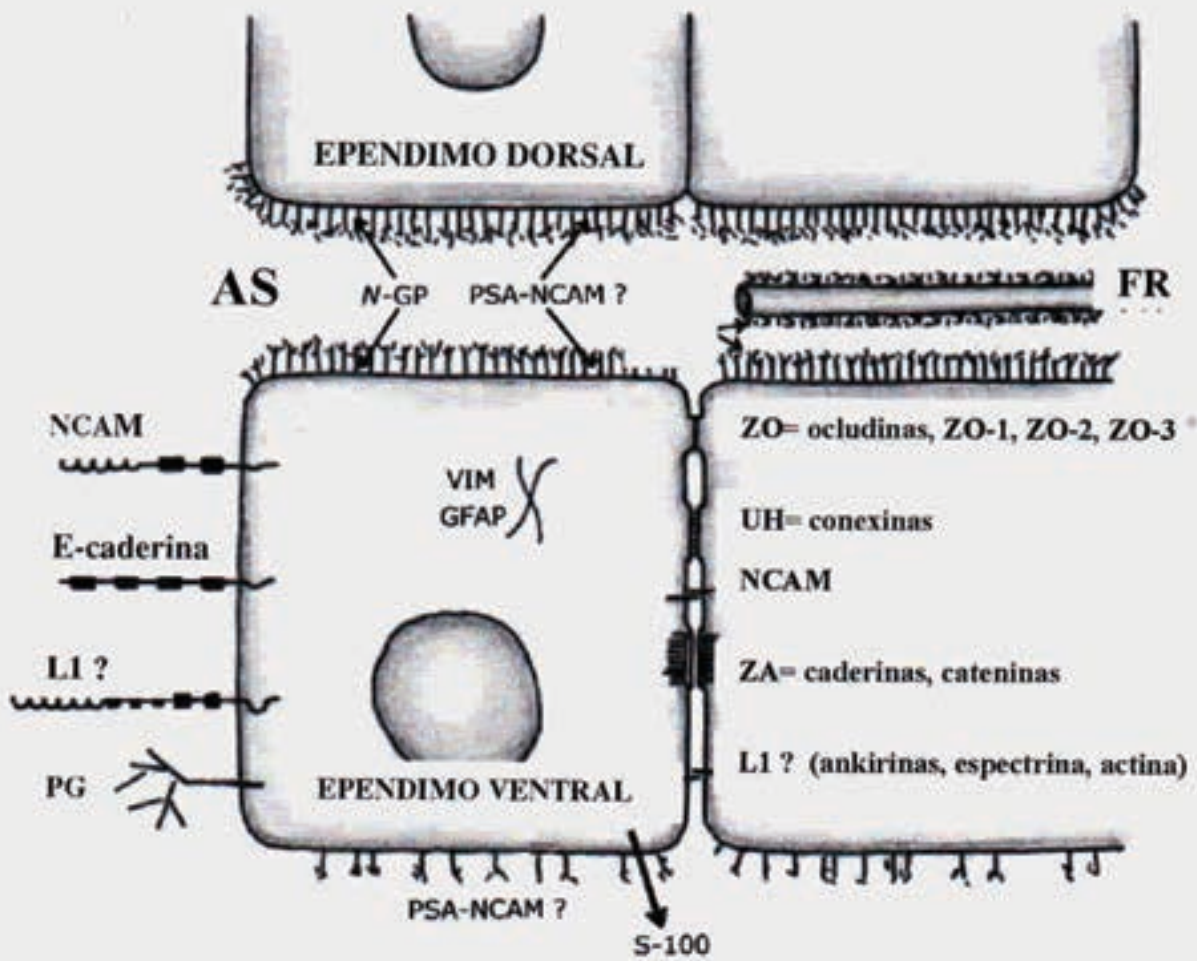


Fig. II. Esquema que representa los dos mecanismos que favorecen la mantención de la comunicación del sistema ventricular. Representación del epéndimo cúbico del techo y del epéndimo columnar del piso del extremo caudal del acueducto de Silvo (AS). Tanto la fibra de Reissner (FR), como el glicocálix de las células ependimarias de esta región son ricas en compuestos sialilados como N-sialoglicoproteínas (N-GP) o cadenas de ácido polisiálico (PSA-NCAM), que por su carga negativa favorece la repulsión de las paredes de esta cavidad.

Referencias

- *Blackshear PJ, Graves JP, Stumpo DJ, Cobos I, Rubenstein JLR, Zeldin DC (2003)*. Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development* 130: 4539-4552.
- *Borit A (1976)*. Communicating hydrocephalus causing aqueductal stenosis. *Neuropediatric* 7: 416-22.
- *Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Iliuart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J (1998)*. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochemie* 80:173-95.
- *Bronson RT, Lane PW (1990)*. Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Dev Brain Res* 54: 131-136.
- *Bruni JE, Del Bigio MR, Cardoso E, Persaud T (1988)*. Hereditary hydrocephalus in laboratory animals and humans. *Exp Pathol* 35: 239-246.
- *Chae TA, Kim S, Marz KE, Hanson PI, Walsh CA (2004)*. The hyh mutation uncovers roles for aSnap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36: 264-270.
- *Cifuentes M, Rodríguez S, Pérez J, Grondona JM, Rodríguez EM, Fernández-Llebrez P (1994)*. Decreased cerebrospinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of Reissner's fiber. *Exp Brain Res* 98:431-40
- *Dahme M, Bartsch U, Martín R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (1997)*. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* 17: 346-49.
- *Danielian PS, McMahon AP (1996)*. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383: 332-334.
- *Davy BE, Robinson ML (2003)*. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Human Mol Gen* 12: 1163-1170.
- *Domínguez Pinos MD, Páez P, Jiménez A, Weil B, Arráez MA, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM (2004; enviado)*. Ependymal Denudation Occurs in Human Fetuses with a Moderate Communicating Hydrocephalus. *J Neuropath Exp Neurol*
- *Estivill-Torrús G, Vitalis T, Fernández-Llebrez P, Price DJ (2001)*. The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech Dev* 109: 215-224.
- *Fernández-Llebrez P, Grondona JM, Pérez J, López-Aranda MF, Estivill-Torrús G, Llebrez-Zayas PF, Soriano E, Ramos C, Lallemand Y, Bach A, Robert B (2004)*. Msx1-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 574-586.
- *Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek S, De Zeeuw Ch, De Deyn P, Van der Linden, Lemmon V, Kooy RF, Willems P (1998)*. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impares exploration patterns. *Human Mol Genet* 7: 999-1009.
- *Gänzler-Odenthal SI, Redies C (1998)*. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci* 18: 5415-5425.

- *Gobron S, Monnerie H, Meiniel R, Creveaux I, Lehmann W, Lamalle D, Dastugue B, Meiniel A (1996).* SCO-spondin: a new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. *J Cell Sci* 109:1053-61.
- *Hanske B, Thiel Ch, Lubke T, Hasilik M, Honing S, Peters V, Heidemann PH, Hoffmann GF, Berger EG, von Figura K, Korner Ch (2002).* Deficiency of UDP-galactose: N-acetylglucosamine B-1,4-galactosyl-transferase I cause the congenital disorder of glycosylation type II d. *J Clinical Invest* 109:725-33.
- *Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P (2001).* The human sialyltransferase family. *Biochemie* 83:727-37.
- *Haverkamp F, Wölfle J, Aretz M, Krämer A, Höhmann B, Fahnenstich H, Zerres K (1999).* Congenital hydrocephalus internus and aqueduct stenosis: aetiology and implications for genetic counseling. *Eur J Pediatr* 158: 474-478.
- *Herndon RM, Johnson RT, Davis LE, Descalzi LR. (1974).* Ependymitis in mump virus meningitis. *Arch Neurol* 30: 475-79.
- *Herrera H, Rodríguez EM (1990).* Secretory glycoproteins of the rat subcommissural organ are N-linked complex-type glycoproteins. Demonstration by combined use of lectins and specific glycosidase, and by administration of Tunicamycin. *Histochemistry* 93: 607-15.
- *Hong HK, Chakravarti A, Takahashi S (2004).* The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein a is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1748-1753.
- *Hoppe-Hirsch E, Laroussinie F, Brunet L, Sainte-Rose C, Renier D, Cinalli G, Zerah M, Pierre-Kahn A (1998).* Late outcome of the surgical treatment of hydrocephalus. *Child's Nerv Syst* 14: 97-99.
- *Jaeken J, Matthijs G (2001).* Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*; 2:129-51.
- *Jones HC, Dack S, Ellis C (1987).* Morphological aspects of the development of hydrocephalus in a mouse mutant (SUMS/NP). *Acta Neuropathol* 72: 268-76.
- *Jones HC, Bucknall RM (1988).* Inherited prenatal hydrocephalus in the H-Tx rat: A morphological study. *Neuropath Appl Neurol* 14: 263-74.
- *Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez P, Rodríguez EM, Pérez-Fígares JM (2001).* A programmed ependymal denudation occurring during the embryonic life precedes the development of congenital hydrocephalus in the mutant mouse hyh. *J Neuropathol Ex Neurol* 60: 1105-1119.
- *Kelm S, Schauer R (1997).* Sialic acid in molecular and cellular interactions. *Int Review Cytol* 175:137-240.
- *Lagunowich LA, Schneider JC, Chasen S, Grunwald GB (1992).* Immunohistochemical and biochemical analysis of N-cadherin expression during CNS development. *J Neurosci Res.* 32: 202-208.
- *Ling EA, Kaur C, Lu J (1998).* Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc Res Tech* 43-56.
- *Lippoldt A, Jansson A, Kniesel U, Andbjør B, Andersson A, Wolburg H, Fuxe K, Haller H (2000).* Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Res* 854:197-206.
- *Louvi A, Wassef M (2000).* Ectopic engrailed 1 expression in the dorsal midline causes cell death, abnormal differentiation of circumventricular organs and errors in axonal pathfinding. *Development* 127: 4061-4071.

- *Lu J, Kaur C, Ling EA (1996)*. An immunohistochemical study of the intraventricular macrophages in induced hydrocephalus in prenatal rats following a maternal injection of 6-aminonicotinamide. *J Anat* 188:491-95.
- *Margolis G., Killham L (1969)*. Hydrocephalus in hamsters, ferrets, rats and mice following inoculations with reovirus type I. *II Pathogenic Studies. Lab Invest* 21: 189-98.
- *Marquardt T, Denecke J (2003)*. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr* 162 (6): 359-79.
- *McComb JG (1997)*. The cerebrospinal fluid, hydrocephalus, and cerebral edema. In: RL Davis, DM Robertson, eds. *Textbook of Neuropathology*. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 225-51.
- *Meiniel A (2001)*. SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/Reissner's fiber complex: evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures. *Microsc Res Tech* 52(5):484-95.
- *Monnerie H, Dastugue B, Meiniel A (1998)*. Effect of synthetic peptides derived from OSC-spondin conserved domains on chick cortical and spinal-cord neurons in cell cultures. *Cell Tissue Res* 293:407-18.
- *Newberne PM (1962)*. The subcommissural organ of the vitamin B12-deficient rat. *J Nutrition* 76: 393-413.
- *Nojima Y, Enzan H, Hayashi Y, Nakayama H, Kiyoku H, Hiroi M, Mori K (1998)*. Neuroepithelial and ependymal changes in H-Tx rats with congenital hydrocephalus: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Pathol Int* 48: 115-125.
- *Nualart F, Hein S, Rodríguez EM, Oksche A (1991)*. Identification and partial characterization of the secretory glycoproteins of the bovine subcommissural organ-Reissner's fiber complex. Evidence for the existence of two precursor forms. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11: 227-238.
- *Overholser MD, Whitley JR, O'Dell BL, Hogan AG (1954)*. The ventricular system in hydrocephalic rat brains produced by a deficiency of vitamin B12 or of folic acid in the maternal diet. *Anat Rec* 120: 917-934.
- *Page RB, Leure-duPree AE (1983)*. Ependymal alterations in hydrocephalus. In: JH Wood ed. *Neurobiology of cerebrospinal fluid*. New York: Plenum Press; 789-820.
- *Pérez-Fígares JM, Jiménez A, Pérez-Martín M, Fernández-Llebréz P, Cifuentes M, Riera P, Rodríguez S, Rodríguez EM (1998)*. Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropath Exp Neurol* 57: 188-202.
- *Rodríguez S, Rodríguez PA, Banse C, Rodríguez EM (1987)*. Reissner's fiber, massa caudalis and ampolla caudalis in the spinal cord of lamprey larvae (*Geotria australis*). *Cell Tissue Res* 247: 359-66.
- *Rodríguez S, Vio K, Wagner C, Barriá M, Navarrete E, Ramírez VD, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM (1999)*. Changes in the cerebrospinal fluid monoamines in rats with an immunoneutralization of the SCO-Reissner's fiber complex by maternal delivery of antibodies. *Exp Brain Res* 128: 278-90.
- *Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibaata S, Koike M, Takano H, Ueda S, Uchiyama Y, Noda T, Okano H (2002)*. RNA-binding protein Musashi family: roles of CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 15194-15199
- *Sarnat HB (1992)*. Role of human fetal ependyma. *Pediatric Neurol* 8: 163-178.
- *Sarnat HB (1995)*. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 1-15.
- *Sarnat HB (1998)*. Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc Res Tech* 41: 14-28.

-
- *Schrander-Stumpel C, Fryns J-P (1998)*. Congenital hydrocephalus: nosology and guide lines for clinical approach and genetic counselling. *Eur J Pediatr* 157: 355-362.
 - *Takeuchi IK, Takeuchi YT (1986)*. Congenital hydrocephalus following X-irradiation of pregnant rats on an early gestational day. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8: 143-50.
 - *Tullio AN, Bridgman PC, Tresser NJ, Chan CC, Conti MA, Adelstein RS, Hara Y (2001)*. Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol* 433: 62-74.
 - *Vio K, Rodríguez S, Navarrete E, Pérez-Fígares J, Jiménez A, Rodríguez EM (2000)*. Hydrocephalus induced by the immunological knockout of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex by maternal delivery of anti-RF antibodies. *Exp brain Res* 135: 41-52.
 - *Wagner C, Bätz LF, Rodríguez S, Jiménez AJ, Páez P, Tomé M, Pérez-Fígares JM, Rodríguez EM (2003)*. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1019-1040.
 - *Weller S, Gärtner J (2001)*. Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): mutations in the LICAM gene. *Hum Mut* 18: 1-12.
 - *Williams B (1973)*. Is aqueductal stenosis a result of hydrocephalus? *Brain* 96: 399-412.
 - *Wong EV, Kenwrick S, Willems P, Lemmon V (1995)*. Mutation in the cell adhesion molecule L1 causes mental retardation. *TINS* 18: 168-72.

María I. Martínez León · Luisa Ceres Ruiz ·
Juan E. Gutiérrez (Editors)

Learning Pediatric Imaging

100 Essential Cases

MARÍA I. MARTÍNEZ LEÓN
Radiology Department
Pediatric Radiology Unit
Hospital Materno-Infantil de Carlos Haya
Av. Pintor Sorolla 16
29016 Málaga
Spain

JUAN E. GUTIÉRREZ
Health Science Center
University of Texas
Elmscourt
78230 San Antonio, TX
USA

LUISA CERES-RUIZ
Pediatric Radiology
Pediatric Radiology Unit
Hospital Materno-Infantil de Carlos Haya
Arroyo de los Angeles
29011 Málaga
Spain

ISBN 978-3-642-16891-8

e-ISBN 978-3-642-16892-5

DOI 10.1007/978-3-642-16892-5

Springer Heidelberg Dordrecht London New York

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011

This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other way, and storage in data banks. Duplication of this publication or parts thereof is permitted only under the provisions of the German Copyright Law of September 9, 1965, in its current version, and permission for use must always be obtained from Springer-Verlag. Violations are liable for prosecution under the German Copyright Law.

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

Product liability: The publishers cannot guarantee the accuracy of any information about dosage and application contained in this book. In every individual case the user must check such information by consulting the relevant literature.

Cover design: eStudioCalamar, Figueres/Berlin

Printed on acid-free paper

9 8 7 6 5 4 3 2 1

Springer is part of Springer Science+Business Media (www.springer.com)

Contents

Case 3.1	Acute Disseminated Encephalomyelitis	2
	Elisa Cuartero Martínez and María I. Martínez León	
Case 3.2	Multiple Sclerosis	4
	Beatriz Asenjo García	
Case 3.3	Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome	6
	Miguel Angel López Pino	
Case 3.4	Focal Cortical Dysplasia	8
	Mercedes Bernabé Durán and María I. Martínez León	
Case 3.5	CNS Takayasu Arteritis	10
	María I. Martínez León and Jorge Garín Ferreira	
Case 3.6	Premamilar Ventriculostomy	12
	M ^a Dolores Domínguez Pino and María I. Martínez León	
Case 3.7	Bilateral Cystic Microphthalmia (Bilateral Cystic Eye)	14
	Lourdes Parra Ruiz and María I. Martínez León	
Case 3.8	Tuberculous Meningitis	16
	Miguel Angel López Pino	
Case 3.9	Spinal Epidural Abscess	18
	Víctor Pérez Candela	
Case 3.10	Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke (MELAS) Syndrome	20
	L. Santiago Medina and Sara M. Koenig	

192 **Case 3.6**

193 **Premamilar Ventriculostomy**

194 ■ M^a Dolores Domínguez Pino and María I. Martínez León

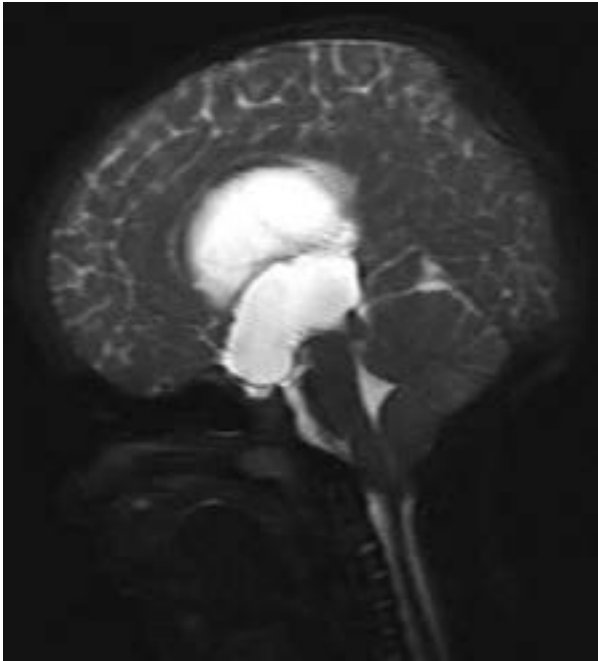


Fig. 3.21



Fig. 3.22

[AU11]

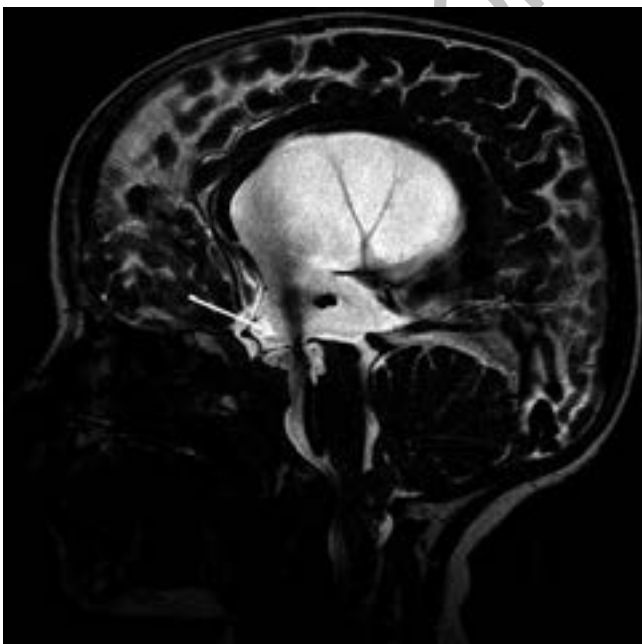


Fig. 3.23



Fig. 3.24

[AU2] Case 3.6a: Hydrocephalus due myelomeningocele in a 6-year-old boy who needs premamilar ventriculostomy (PV) for cerebrospinal fluid (CSF) drainage. 195
 Case 3.6b: A 3-year-old boy with cerebellar astrocytoma and secondary obstructive hydrocephalus. 196
 197
 198

High levels of CSF in ventricular system needs alternative pathways of drainage, classically ventriculoperitoneal derivations solve this problem. Nowadays, ventricular endoscopy allows ventriculocisternotomy for treatment of hydrocephalus. **Comments** 199
 200
 201

The most frequent third ventriculostomy is premamilar that offers significant advantages: combines a minimal invasive approach with good visual control of the field of view, and low risk of vascular or neural damage. The perforation point is located at the midpoint of the height of the triangle formed by the base of the mamillary bodies and the apex of the infundibular recess. 202
 203
 204
 205
 206

The radiological criteria for success can be: 207

1. Reduction in ventricular size ranging from 10% to 50% can be observed in the first week, even if the ventricles remain large. 208
 209
2. Periventricular bright on T2, if present before operation, can disappear. 210
3. CSF flow artifact must be visible in midline on sagittal T2. 211
4. The floor of the third ventricle, if bulging downward in the preoperative images, must be straight on postoperative images. 212
 213
5. Atrial diverticula and pseudocystic dilatation of the suprapineal recess, if present preoperatively, must disappear or decrease significantly. 214
 215
6. Pericerebral sulci, if not visible before operation, must reappear or increase in size. 216

Case 3.6a: Preoperative sagittal T2 view of third ventricle showing triventricular hydrocephalus with suprachiasmatic recess dilated, the floor of the third ventricle is deformed and bulges into the prepontine cistern (Fig. 3.21). Endoscopic view of the floor of the third ventricle immediately after monopolar coagulation in PV (image yielded by Dr. Mosqueira from Neurosurgery Department of Carlos Haya Hospital) (Fig. 3.22). After 2 years, sagittal T2 showing ventriculostomy patence, flow void artifact is visible through the floor of the third ventricle (arrow) (Fig. 3.23). **Imaging Findings** 218
 219
 220
 221
 222
 223

Figure 3.21 224

Figure 3.22 225

Figure 3.23 226

Case 3.6b: Phase-contrast cine MRI showing functional third ventriculostomy (Fig. 3.24). 227

Figure 3.24 228
 229

Further Reading

Books

- Atlas SW (2004) *RM de cabeza y columna*. Ed. Marban, Madrid
- Barkovich JA (2005) *Pediatric neuroimaging*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA
- Cinalli et al. (ed) (2005) *Pediatric hydrocephalus*, vol 27. Springer, pp 397–405
- Harrison (2010) *Principios de medicina interna*. 12ª edición, vol II. Ed. Interamericana McGraw-Hill, p 2308
- Ketonen LM, Hiwatashi A, Sidhu R, Westesson P-L (2005) *Pediatric brain and spine. An atlas of MRI and spectroscopy*, vol 4. Springer, New York, pp 160–161
- Mann I (1957) Abnormalities affecting the eye as a whole. In: Mann I (ed) *Developmental abnormalities of the eye*. Lippincott, Philadelphia, PA, pp 60–66
- Mukherji CM (1996) *Imaging of the pediatric head, neck and spine*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 17.12,698
- Osborn A et al (2004a) *Diagnostic imaging: Brain*. AMIRSYS, Salt Lake City, UT
- Osborn A et al (2004) *Diagnostic imaging: brain*. Amirsys, Salt Lake City, UT, 10: 1-10-24
- Raine CS (2000) *Esclerosis múltiple. Bases clínicas y patogénicas*. ISBN: 84-7714-186-X, 2000. Editores Médicos S.A

Web Link

- <http://emedicine.medscape.com/article/1147044-overview>
- www.esclerosismultiple.com
- <http://www.uptodate.com/home/index.html>
- www.ajnr.org
- <http://emedicine.medscape.com/article/1146574-overview>
- <http://www.hydroassoc.org>
- <http://www.scribd.com/doc/2437580>
- <http://www.uptodate.com/home/index.html>
- <http://www.pennstatehershey.org/healthinfo/hie/>
- http://www.umdf.org/site/c.otJVJ7MMIqE/b.5692881/k.4B7B/Types_of_Mitochondrial_Disease.htm#MELAS/

Articles

- Abdel Razek et al (2009) Disorders of cortical formation: MR imaging features. *AJNR Am J Neuroradiol* 30:4–11
- Ahn KJ, You WJ, Jeong SL, Lee JW, Kim BS, Lee JH et al (2004) Atypical manifestations of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome: findings on diffusion imaging and ADC mapping. *Neuroradiology* 46:978–983
- Albernaz VS, Castillo M, Hudgins PA, Mukherji SK (1997) Imaging findings in patients with clinical anophthalmos. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:555–561
- Alehan F, Erol I, Agildere AM, Ozcay F, Baskin E, Cengiz N et al (2007) Posterior leukoencephalopathy syndrome in children and adolescents. *J Child Neurol* 22:406–413
- Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM et al (1990) The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 33:1129–1134

- Auletta J, John CC (2001) Spinal epidural abscesses in children: A 15 year experience and review of the literature. *Clin Infect Dis* 32:9–16
- Bair-Merritt M, Chung C, Collier A (2000) Spinal epidural abscess in a young child. *Pediatrics* 106(3):E39
- Bakshi R, Thompson AJ, Rocca MA, Pelletier D, Dousset V, Barkhof F et al (2008) MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet Neurol* 7:615–625
- Bargalló N, Olondo L, García AI, Capurro S, Caral L, Rumia J (2005) Functional analysis of third ventriculostomy patency by quantification of CSF stroke volume by using cine phase-contrast MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 26:2514–2521
- Bernaerts A, Vanhoenacker FM, Parizel PM, Van Goethem JW, Van Alena R, Laridon A et al (2003) Tuberculosis of the central nervous system: overview of neuroradiological findings. *Eur Radiol* 13:1876–1890
- Bilaniuk LT, Farber M (1992) Imaging of developmental anomalies of the eye and the orbit. *AJNR Am J Neuroradiol* 13:793–804
- Bilginer B, Oguz KK, Akalan N (2009) Endoscopic third ventriculostomy for malfunction in previously shunted infants. *Childs Nerv Syst* 25:683–688
- Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN et al (2003) American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:603–662
- Bronen RA, Vives KP, Kim JH, Fulbright RK, Spencer SS, Spencer DD (1997) Focal cortical dysplasia of Taylor, balloon cell subtype: MR differentiation from low grade tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:1141–1151
- Callen DJ, Shroff MM, Branson HM, Li DK, Lotze T, Banwell DS (2009) Role of MRI in the differentiation of ADEM from MS in children. *Neurology* 72:968–973
- Casey SO, Sampaio RC, Michel E, Truwit CL (2000) Posterior reversible encephalopathy syndrome: utility of fluid-attenuated inversion recovery MR imaging in the detection of cortical and subcortical lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:1199–1206
- Chan KH, Cheung RT, Fong CY et al (2003) Clinical relevance of hydrocephalus as a presenting feature of tuberculous meningitis. *QJM* 96:643–648
- Chan KH, Cheung RT, Lee R, Mak W, Ho SL (2005) Cerebral infarcts complicating tuberculous meningitis. *Cerebrovasc Dis* 19:391–395
- Chaudhry IA, Arat YO, Shamsi FA, Boniuk M (2004) Congenital microphthalmos with orbital cysts: distinct diagnostic features and management. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 20:452–457
- Chavhan GB, Babyn PS, Jankharia BG, Cheng Hai-Ling M, Shroff MM (2008) Steady-state MR imaging sequences: physics, classification, and clinical applications. *Radiographics* 28: 1147–1160
- Chen WC, Wang JL, Wang JT, Chen YC, Chang SC (2008) Spinal epidural abscess due to *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and outcomes. *J Microbiol Immunol Infect* 41:215–221
- Colliot O et al (2006) Individual voxel-based analysis of gray matter in focal cortical dysplasia. *Neuroimage* 29:162–171
- Colombo N et al (2003) Focal cortical dysplasias: MR imaging, histopathologic and clinical correlations in surgically treated patients with epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:724–335
- Covarrubias DJ, Luetmer PH, Campeau NG (2002) Posterior reversible encephalopathy syndrome: prognostic utility of

[AU8]

498	quantitative diffusion-weighted MR images. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 23:1038–1048	559
499		560
500	Dale RC, De Sousa C, Chong WK, Cox TC, Harding B, Neville BG (2000) Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. <i>Brain</i> 123:2407–2422	561
501		562
502		563
503		564
504	Dale RC, Brilot F, Banwell B (2009) Pediatric central nervous system inflammatory demyelination: acute disseminated encephalomyelitis, clinically isolated syndromes, neuromyelitis optica, and multiple sclerosis. <i>Curr Opin Neurol</i> 22:233–240	565
505		566
506		567
507		568
508	Daxecker F, Felber S (1993) Magnetic resonance imaging features of congenital anophthalmia. <i>Ophthalmologica</i> 206:139–142	569
509		570
510		571
511	Di Carlo P, Cabibi D, Casuccio A, Mazzola A, Romano A, Titone L et al (2008) Features in tubercular meningoencephalitis diagnosis: 18 childhood cases. <i>Am J Infect Dis</i> 4:187–192	572
512		573
513		574
514	Donmez FY, Aslan H, Coskun M (2009) Evaluation of possible prognostic factors of fulminant acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) on magnetic resonance imaging with fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) and diffusion-weighted imaging. <i>Acta Radiol</i> 50(3):334–339	575
515		576
516		577
517		578
518		579
519	Doris D et al (2003) Proton MR spectroscopy in the diagnostic evaluation of suspected mitochondrial disease. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 22:33–41	580
520		581
521		582
522	Druhan SM, Shiels WE, Kang DR, Elton SW, Koranyi K (2006) Successful sonographically guided drainage of epidural abscess. <i>AJR Am J Roentgenol</i> 187:512–514	583
523		584
524		585
525	Duchowny M (2009) Et al Clinical, functional, and neurophysiologic assessment of dysplastic cortical networks: implications for cortical functioning and surgical management. <i>Epilepsia</i> 50:19–27	586
526		587
527		588
528		589
529	Enberg RN, Kaplan RJ (1974) Spinal epidural abscess in children: early diagnosis and immediate surgical drainage is essential to forestall paralysis. <i>Clin Pediatr</i> 13:247–253	590
530		591
531		592
532	Farinha NJ, Razali KA, Holzel H, Morgan G, Novelli VM (2000) Tuberculosis of the central nervous system in children: a 20-year survey. <i>J Infect</i> 41:61–68	593
533		594
534		595
535	Filippi M (2008) Multiple sclerosis, Part I: Background and conventional MRI. Preface. <i>Neuroimaging Clin N Am</i> 18:XV–XVI	596
536		597
537	Fischer EG, Greene CS, Winston KR (1981) Spinal epidural abscess in children. <i>Neurosurgery</i> 9:257–260	598
538		599
539	Fok W, Sun L, Wong N, Lau P, Cheung H (2007) Spontaneous spinal epidural haematoma in a 15-month-old boy presenting with a wry neck: a case report. <i>J Orthop Surg (Hong Kong)</i> 15:373–375	600
540		601
541		602
542		603
543	Goto Y, Hoarai S, Matsuoka T et al (1992) Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): a correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. <i>Neurology</i> 42:545–550	604
544		605
545		606
546		607
547	Gotway MB, Araoz PA, Macedo TA, Stanson AW, Higgins ChB, Ring EJ et al (2005) Imaging findings in Takayasu's arteritis. <i>AJR Am J Roentgenol</i> 184:1945–1950	608
548		609
549		610
550	Gundlach KK, Guthoff RF, Hingst VH, Schittkowski MP, Bier UC (2005) Expansion of the socket and orbit for congenital clinical anophthalmia. <i>Plat Reconstr Surg</i> 116:1214–1222	611
551		612
552		613
553	Hailong F, Guangfu H, Haibin T, Hong P, Yong C, Weidong L, Dongdong Z (2008) Endoscopic third ventriculostomy in the management of communicating hydrocephalus: a preliminary study. <i>J Neurosurg</i> 109:923–930	614
554		615
555		616
556		617
557	Hoffmann M, Corr P, Robbs J (2000) Cerebrovascular findings in Takayasu disease. <i>J Neuroimaging</i> 10:84–90	618
558		619
	Honkaniemi J, Dastidar P, Kähärä V, Haapasalo H (2001) Delayed MR imaging changes in acute disseminated encephalomyelitis. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 22:1117–1124	
	Hopper K, Sherman JL, Boal DK, Egli KD (1992) CT and MR imaging of the pediatric orbit. <i>Radiographics</i> 12:485–503	
	Huynh W, Cordato DJ, Kehdi E, Masters LT, Dedousis C (2008) Post-vaccination encephalomyelitis: literature review and illustrative case. <i>J Clin Neurosci</i> 15:1315–1322	
	Inglese M, Salvi F, Lannucci G, Mancardi GL, Mascaldi M, Filippi M (2002) Magnetization transfer and diffusion tensor MR imaging of acute disseminated encephalomyelitis. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 23:267–272	
	Jacobsen FS, Sullivan B (1994) Spinal epidural abscess in children. <i>Orthopedics</i> 17:1131–1134	
	Jones BP, Ganesan V, Saunders DE, Chong WK (2010) Imaging in childhood arterial ischaemic stroke. <i>Neuroradiology</i> 52:577–589	
	Kaltreider SA (2000) The ideal ocular prosthesis: analysis of prosthetic volume. <i>Ophthalm Plast Reconstr</i> 16:388–392	
	Kaltreider SA, Jacobs JL, Hughes MO (1999) Predicting the ideal implant size before enucleation. <i>Ophthalm Plast Reconstr</i> 15:37–43	
	Katrak SM, Shembalkar PK, Bijwe SR, Bhandarkar LD (2000) The clinical, radiological and pathological profile of tuberculous meningitis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. <i>J Neurol Sci</i> 181:118–126	
	Kiminobu Y et al (2001) Diffusion-weighted MR imaging in a case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 22:269–272	
	Klimo P, Goumnerova LC (2006) Endoscopic third ventriculotomy for brainstem tumors. <i>J Neurosurg</i> 105:271–274	
	Kwon S, Koo J, Lee S (2001) Clinical spectrum of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. <i>Pediatr Neurol</i> 24:361–364	
	Lamy C, Oppenheim C, Méder JF, Mas JL (2004) Neuroimaging in posterior reversible encephalopathy syndrome. <i>J Neuroimaging</i> 14:89–96	
	Lee VH, Wijidicks EF, Manno EM, Rabinstein AA (2008) Clinical spectrum of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. <i>Arch Neurol</i> 65:205–210	
	Lipina R, Reguli S, Dolezilová V, Kucíková M, Podesvová H (2008) Endoscopic third ventriculostomy for obstructive hydrocephalus in children younger than 6 months of age: is it a first-choice method? <i>Childs Nerv Syst</i> 24:1021–1027	
	Martínez-León MI (2002) Microftalmía quística bilateral: ojo quístico clínico. <i>Radiología</i> 44(1):41–42	
	Matsunaga N, Hayashi K, Sakamoto I, Matsuoka Y, Ogawa Y, Honjo K et al (1998) Takayasu arteritis: MR manifestations and diagnosis of acute and chronic phase. <i>J Magn Reson Imaging</i> 8:406–414	
	Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF (1998) The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. <i>Brain</i> 121:3–24	
	Mukherjee P, McKinstry RC (2001) Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome: evaluation with diffusion-tensor MR imaging. <i>Radiology</i> 219:756–765	
	Nastri MV, Baptista LP, Baroni RH, Blasbalg R, de Avila LF, Leite CC et al (2004) Gadolinium-enhanced three-dimensional MR angiography of Takayasu arteritis. <i>Radiographics</i> 24:773–786	

- 680 O'Brien DF, Seghedoni A, Collins DR, Hayhurst C, Mallucci CL
682 (2006) Is there an indication for ETV in young infants in aeti-
682 ologies other than isolated aqueduct stenosis? *Childs Nerv*
683 *Syst* 22:1565–1572
- 684 Oberhansli C, Charles-Messance D, Munier F, Spahn B (2003)
686 Management of microphthalmos and anophthalmos: pros-
686 thetic experience. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 220:134–137
- 687 Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, Kleinert R, Payer F,
689 Kleinert G et al (1991) MRI in tuberculous meningoencepha-
689 litis: report on four cases and review of the neuroimaging
690 literature. *J Neurol* 238:340–344
- 691 Ozates M, Kemaloglu S, Gurkan F, Ozkan U, Hosoglu S, Simsek
692 MM (2000) CT of the brain in tuberculous meningitis.
693 A review of 289 patients. *Acta Radiol* 41:13–17
- 694 Palmini A, Najm I, Avanzini G et al (2004) Terminology and clas-
696 sification of the cortical dysplasias. *Neurology* 62:S2–S8
- 697 Phelan JA et al (2008) Pediatric neurodegenerative white matter
698 processes: leukodystrophies and beyond. *Pediatr Radiol*
699 38:729–749
- 700 Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA,
700 Ebers GC et al (1983) New diagnostic criteria for multiple
702 sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13:
702 227–331
- 703 Provenzale JM, Petrella JR, Cruz LC Jr, Wong JC, Engelter S,
705 Barboriak DP (2001) Quantitative assessment of diffusion
706 abnormalities in posterior reversible encephalopathy syn-
706 drome. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1455–1461
- 707 Rajan J, Kannan K, Kesavadas C, Thomas B (2009) Focal Cortical
709 Dysplasia (FCD) lesion analysis with complex diffusion
710 approach. *Comput Med Imaging Graph* 33:553–558
- 711 Ranasuriya DG, Feld RJ, Nairn SJ (2008) A case of acute dissemi-
712 nated encephalomyelitis in a 12-year-old boy. *Pediatr Emerg*
712 *Care* 24(10):697–699
- 713 Rastorgi S, Lee Ch, Salamon N (2008) Neuroimaging in pedi-
715 atric epilepsy: a multimodality approach. *Radiographics* 28:
715 1079–1095
- 716 Ringleb PA, Strittmatter EI, Loewer M, Hartmann M, Fiebach JB,
718 Weber R et al (2005) Cerebrovascular manifestations of
719 Takayasu arteritis in Europe. *Rheumatology (Oxford)* 44:
720 1012–1015
- 721 Río J, Rovira A, Tintoré M, Huerga E, Nos C, Tellez N et al (2008)
722 Relationship between MRI lesion activity and response to
722 IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients.
723 *Mult Scler* 14:479–484
- 724 Ros-Lopez B, Jaramillo-Dallimonti AM, de Miguel-Puello LS,
726 Rodríguez-Barceló S, Domínguez Páez M, Ibáñez-Botella G
726 et al (2009) Ventricular haemorrhage in preterm neonates
728 and posthemorrhagic hydrocephalus. Proposal of a manage-
729 ment protocol based on early ventriculo-peritoneal shunt.
730 *Neurocirugía* 20:15–24
- 731 Rossi A (2008) Imaging of acute disseminated encephalomyeli-
732 tis. *Neuroimaging Clin N Am* 18:149–161
- 733 Rovira A, Swanton J, Tintoré M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M
733 et al (2009) A single, early magnetic resonance imaging study
735 in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:587–592
- 736 Rubin G, Michowiz SD, Ashkenasi A, Tadmor R, Rappaport ZH
737 (1993) Spinal epidural abscess in the pediatric age group: case
738 report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J*
739 12:1007–1011
- 740 Ryutarou U, Kushihashi T, Tanaka E, Baba M, Usi N, Fujisawa H
740 et al (2006) Diffusion-weighted MR imaging of early-stage
741 Creutzfeldt-Jakob disease: typical and atypical manifesta-
741 tions. *Radiographics* 26:S191–S194
- 742 Saenz RC (2005) The disappearing basal ganglia sign. *Radiology*
743 234:242–243
- 744 Scaglia F et al (2005) Predominant cerebellar volume loss as a
745 neuroradiologic feature of pediatric respiratory chain
746 defects. *AJNR Am J Neuroradiol* 26:1675–1680
- 747 Schlaug G, Diewert B, Benfield A, Edelman RR, Warach S (1997)
748 Time course of the apparent diffusion coefficient (ADC)
749 abnormality in human stroke. *Neurology* 49:113–119
- 750 Schmidt WA, Nerenheim A, Seipelt E, Poehls C, Gromnica-Ihle E
751 (2002) Diagnosis of early Takayasu arteritis with sonogra-
752 phy. *Rheumatology* 41:496–502
- 753 Schoeman J, Hewlett R, Donald P (1988) MR of childhood tuber-
754 culous meningitis. *Neuroradiology* 30:473–477
- 755 Schroff MM, Soares-Fernandez JP, Whyte H, Raybaud C (2010)
756 MR imaging for diagnostic evaluation of encephalopathy in
757 the newborn. *Radiographics* 30:763–780
- 758 Seyfert S, Klapps P, Meisel C, Fisclier T, Junghan U (1990)
759 Multiple sclerosis and other immunologic diseases. *Acta*
760 *Neurol Scand* 81:37–42
- 761 Sikaroodi H, Motamedi M, Kahnooji H, Gholamrezanezhad A,
762 Yousefi N (2007) Stroke as the first manifestation of Takayasu
763 Arteritis. *Acta Neurol Belg* 107:18–21
- 764 Singh I, Haris M, Husain M, Husain N, Rastogi M, Gupta RK
765 (2008) Role of endoscopic third ventriculostomy in patients
766 with communicating hydrocephalus: an evaluation by MR
767 ventriculography. *Neurosurg Rev* 31:319–325
- 768 Stivaros SM, Sinclair D, Bromiley PA, Kim J, Thorne J, Jackson A
769 (2009) Endoscopic third ventriculostomy: predicting out-
770 come with phase-contrast MR imaging. *Radiology* 252:
771 825–832
- 772 Stott VL, Hurrell MA, Anderson TJ (2005) Reversible posterior
773 leukoencephalopathy syndrome: a misnomer reviewed.
774 *Intern Med J* 35:83–90
- 775 Sue CM et al (1998) Neuroradiological features of six kindreds
776 with MELAS tRNA^{Leu} A3243G point mutation: implications
777 for pathogenesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:
778 233–240
- 779 Tassil L, Colombo N, Garbelli R et al (2002) Focal cortical dys-
780 plasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and
781 surgical outcome. *Brain* 125:1719–1732
- 782 Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA (1971) Focal
783 dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol*
784 *Neurosurg Psychiatry* 34:369–387
- 785 Tenenbaum S, Chitnis T, Ness J, Hahn JS (2007) Acute dissemi-
786 nated encephalomyelitis. *Neurology* 17(68):S23–S36
- 787 Traboulsee AL, Li DK (2006) The role of MRI in the diagnosis of
788 multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98:125–146
- 789 Tur C, Téllez N, Rovira A, Tintoré M, Río J, Nos C et al (2008)
790 Acute disseminated encephalomyelitis: study of factors
791 involved in a possible development towards multiple.
792 *Neurologia* 23(9):546–554
- 793 Walter RS, King JC, Manley J, Rigamonti D (1991) Spinal epidu-
794 ral abscess in infancy: successful percutaneous drainage in a
795 nine-month-old and review of the literature. *Pediatr Infect*
796 *Dis J* 10:860–864
- 797 Yamada I, Numano F, Suzuki S (1993) Takayasu arteritis: evalua-
798 tion with MR imaging. *Radiology* 188:89–94
- 799 Zivadinov R, Cox JL (2007) Neuroimaging in multiple sclerosis.
800 *Int Rev Neurobiol* 79:449–474

Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus

Ruth Roales-Buján · Patricia Páez · Montserrat Guerra · Sara Rodríguez · Karin Vío · Ailec Ho-Plagaro · María García-Bonilla · Luis-Manuel Rodríguez-Pérez · María-Dolores Domínguez-Pinos · Esteban-Martín Rodríguez · José-Manuel Pérez-Fígares · Antonio-Jesús Jiménez

Received: 25 January 2012/Revised: 25 April 2012/Accepted: 27 April 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Hydrocephalic *hyh* mutant mice undergo a programmed loss of the neuroepithelium/ependyma followed by a reaction of periventricular astrocytes, which form a new cell layer covering the denuded ventricular surface. We present a comparative morphological and functional study of the newly formed layer of astrocytes and the multiciliated ependyma of *hyh* mice. Transmission electron microscopy, immunocytochemistry for junction proteins (N-cadherin, connexin 43) and proteins involved in permeability (aquaporin 4) and endocytosis (caveolin-1, EEA1) were used. Horseradish peroxidase (HRP) and lanthanum nitrate were used to trace the intracellular and paracellular transport routes. The astrocyte layer shares several cytological features with the normal multiciliated ependyma, such as numerous microvilli projected into the ventricle, extensive cell–cell interdigitations and connexin 43-based gap junctions, suggesting that these astrocytes are

coupled to play an unknown function as a cell layer. The ependyma and the astrocyte layers also share transport properties: (1) high expression of aquaporin 4, caveolin-1 and the endosome marker EEA1; (2) internalization into endocytic vesicles and early endosomes of HRP injected into the ventricle; (3) and a similar paracellular route of molecules moving between CSF, the subependymal neuropile and the pericapillary space, as shown by lanthanum nitrate and HRP. A parallel analysis performed in human hydrocephalic fetuses indicated that a similar phenomenon would occur in humans. We suggest that in foetal-onset hydrocephalus, the astrocyte assembly at the denuded ventricular walls functions as a CSF–brain barrier involved in water and solute transport, thus contributing to re-establish lost functions at the brain parenchyma–CSF interphase.

Keywords Cerebrospinal fluid · Congenital hydrocephalus · Ependyma disruption · Astrocyte reaction · Barrier properties · Permeability · Transport · *hyh* mice · Human

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-012-0992-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Roales-Buján · P. Páez · A. Ho-Plagaro · M. García-Bonilla · L.-M. Rodríguez-Pérez · M.-D. Domínguez-Pinos · J.-M. Pérez-Fígares · A.-J. Jiménez (✉)
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,
Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos, 29071
Málaga, Spain
e-mail: ajjimenez@uma.es

M. Guerra · S. Rodríguez · K. Vío · E.-M. Rodríguez
Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Facultad de
Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

Introduction

Congenital hydrocephalus is a developmental brain disorder. In the humans, its incidence is approximately 1–3 in every 1,000 live births. Dilatation of the brain ventricles and elevation of intraventricular pressure in rats with congenital or acquired hydrocephalus have harmful effects on the parenchyma and lead to oedema, oxidative stress [57], proteolytic damages in the white matter [15], cell death and reactive changes in glial cells [17]. Some of these alterations have also been reported in human chronic hydrocephalus [16]. Under these abnormal brain

conditions, some mechanisms can be triggered to partially re-establish brain homeostasis [31].

Astroglial reactions triggered by brain injuries are characterized by the hypertrophy and hyperplasia of astroglial cells. Astrocyte reactions have been reported to inhibit axonal regeneration [7], but have also been associated with the secretion of growth factors and trophic molecules [19, 24, 47, 49] such as NGF, IGF-I and bFGF that promote axonal re-growth [47]. It has been suggested that the astrocyte reaction initially protects the brain tissue and contributes to its functional recovery [22]. Therefore, the beneficial and detrimental functional consequences of these astroglial reactions are under debate [36, 58, 59]. The astrocyte reaction that occurs in the brain of hydrocephalic animals has been thought to be a harmful phenomenon, leading some authors to test the effects of anti-inflammatory drugs in rats that have been made hydrocephalic postnatally [35, 36].

There is a large body of evidence indicating that the neuroepithelium/ependyma lining the ventricular walls of the developing brain plays a key role in the onset and evolution of congenital hydrocephalus [1–3, 18, 26, 52, 55, 61, 65]. There are several ependymal cell lineages lining distinct regions of the ventricular walls. In the cerebral aqueduct of hydrocephalic *hyh* mice, different types of ependymal cells have been reported [65]. Some of these types disrupt, some remain unaffected and other ones proliferate [4, 65]. Recently, different types of ependymal cells have been described in the cerebral aqueduct of human foetuses [55]. Ependymal specializations also occur in other regions of the ventricular system [50]. Most of the different ependymal populations are multiciliated. Their cilia beat in a synchronized manner and thus contribute to the flow of the cerebrospinal fluid (CSF) [43, 68, 69]. Other functions have also been assigned to the multiciliated ependyma, including the regulation of the interaction between the ventricular CSF and the brain extracellular fluid, the clearance of metabolic substances and neurotransmitters and the mediation of adhesion of inflammatory cells [14, 65]. We have previously reported that foetal-onset hydrocephalus in mutant *hyh* mice and in human foetuses is associated with defects in the neuroepithelium/ependyma [18, 30, 43]. Such defects result in the loss of the neuroepithelium/ependyma and in a subsequent astroglial reaction that leads to the development of a new cell layer lining the denuded ventricular surface [18, 41, 65]. The functional significance of the new brain parenchyma/CSF interphase formed by reactive astrocytes is not known.

The present study has been designed to help elucidate the role of the periventricular astroglial reaction in congenital hydrocephalus. The study was performed on *hyh* (hydrocephalus with *hop* gait) [11] mutant mice, in which the onset and evolution of hydrocephalus resemble that of

human congenital hydrocephalus. Two phases have been recognized in the development of congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. During embryonic life, the neuroependyma disruption of the ventral fourth ventricle and cerebral aqueduct is followed by a moderate communicating hydrocephalus. During the first postnatal week, the dorsal wall of the cerebral aqueduct becomes disrupted triggering aqueduct obliteration and the onset of a severe hydrocephalus [65]. The investigation was carried out at the postnatal stages when hydrocephalus is severe and astroglialogenesis and astrocyte reaction are completed [41]. The study also analysed the astrocyte reaction occurring in the denuded ventricular walls of human hydrocephalic foetuses.

Materials and methods

Animals

Mutant *hyh* mice (hydrocephalus with *hop* gait, B6C3Fe-*a/a-hyh/J* strain) and their control littermate wild-type (wt) mice were used [11]. The *hyh* mouse carries a point mutation in the *Napa* gene that encodes α -Snap [13, 25], a protein involved in membrane fusion events. Mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred into two colonies, one at the Animal Experimentation Service of the University of Malaga and the other at the Medical School of the Austral University of Chile, Valdivia, Chile. The housing, handling, care and processing of the animals were conducted in accordance with the European and Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and following the regulations approved by the council of the American Physiological Society. Wt and mutant *hyh* mice were identified by clinical inspection and genotyping [5]. The animals were anesthetized with intraperitoneally administered Dolethal (sodium pentobarbital; Vétoquinol, Lure, France; 0.2 mg/g bodyweight) and killed at the postnatal (P) ages detailed in Table 1.

Human foetuses

Paraffin sections of brains from 8 foetuses presenting communicating hydrocephalus and 15 control foetuses were used (for further information concerning this material see [18]).

Immunocytochemistry

Wt and *hyh* mice were transcardially perfused with Bouin fixative. The brain was dissected out and further fixed by immersion in Bouin fixative for 2 days. Serial paraffin sections were obtained and adjacent sections were

Table 1 Number of animals by age and genotype used in each experiment

Experiment	Immunocytochemistry	Immunofluorescence	HRP tracing (light microscopy)	HRP tracing (electron microscopy)	Lanthanum tracing	Scanning electron microscopy
Animal postnatal age in days (number/genotype)	10, 14, 20, 30 (4 wt and 4 hyh each age)	6 (6 wt, 6 hyh), 14 (6 wt, 6 hyh), 20 (7 wt, 7 hyh), 30 (3 wt, 3 hyh)	3, 8, 14, 30 (2 wt and 4 hyh each age)	3 (2 each condition), 30 (2 wt, 4 hyh)	3 (3 wt, 5 hyh), 6 (3 wt, 5 hyh), 10 (3 wt, 5 hyh), 20 (5 wt, 5 hyh), 30 (3 wt, 5 hyh)	14 (6 hyh), 20 (10 hyh)

Table 2 Primary antibodies used

Antibody (reference)	Source	Type	Dilution	Molecule/structure labelling
Aquaporin 4 (A5971)	Sigma	Rabbit polyclonal	1:400	Water channel protein
Caveolin-1 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, INC, San Diego, CA, USA	Rabbit polyclonal	1:200	Caveolae
Connexin 43	^a	Rabbit polyclonal	1:750	Gap junctions
EEA1 (PA1-063)	Affinity Bioreagents INC, Gonden, CO, USA	Rabbit polyclonal	1:200	Early endosome antigen 1
GFAP (4650)	Biogenesis, Oxford, UK	Rabbit polyclonal	1:250	GFAP intermediate filaments
GFAP (4674)	Abcam, Cambridge, UK	Mouse monoclonal	1:1,000	GFAP intermediate filaments
GLUT1	^b	Rabbit polyclonal	1:1,000	Glucose transporter 1
HRP	^c	Rabbit polyclonal	1:1,000	Injected HRP
N-Cadherin (sc-8939)	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit polyclonal	1:50	N-Cadherin (adherens junctions)
S100 β (ab52642)	Abcam	Rabbit polyclonal	1:200	S100 β
TGN46 (ab16059)	Abcam	Rabbit polyclonal	1:500	Trans-Golgi network
Tubulin β IV (T7941)	Sigma	Mouse monoclonal	1:400	Ependymal cilia
Tubulin β IV (ab11315)	Abcam	Mouse monoclonal	1:100	Ependymal cilia
Vimentin (V4630)	Sigma, St Louis, MO, USA	Goat polyclonal	1:500	Vimentin intermediate filaments

^a Kindly provided by JC Sáez, Catholic University of Chile

^b Kindly provided by CI Ribas, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA

^c Developed at the Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, University of Malaga, Spain

incubated with a series of primary antibodies (Table 2). For further details, see Supplementary data.

Single and double immunofluorescence and confocal microscopy

Wt and hyh mice (Table 1) were transcardially perfused with Bouin fixative or 4 % paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Bouin-fixed brains from P6 (6 days of age) and P30 mice were used to obtain paraffin sections that were hydrated and immunostained. Paraformaldehyde-fixed brains from P14 and P20 mice were used to obtain frozen sections that were immunostained with a free-floating section-staining protocol. In four P20 mice, the ventricular walls of the lateral ventricles were dissected out to obtain whole mounts for

immunostaining. After incubation in the primary antibody (Table 2), appropriate fluorescent secondary antibodies were used.

Adjacent sections from the series obtained from the brain of P6, P20 and P30 wt and hyh mice, and whole mounts from the lateral ventricles of P14 and P20 hyh mice were processed for double immunofluorescence. This procedure allowed the same brain regions to be analysed with a series of antibodies. For further details, see the Supplementary data.

Intracerebroventricular injections of horseradish peroxidase

Wt and hyh mice (Table 1) were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (Sigma, 0.8 μ g/g body weight). Wt and

hyh mice were subperfused into the left lateral ventricle for 5 min with 1 μ l (P3), 1.5 μ l (P8), 2 μ l (P14) and 2.5 μ l (P30) of 3 % horseradish peroxidase (HRP) type IV (Sigma) in 0.9 % sodium chloride. The coordinates for injection in wt and hyh mice at different ages were previously calculated using injections with trypan blue. After the infusion, the needle remained at the injection site for an additional 15 min. The brains were processed to trace HRP at the light microscope. The brains were dissected out, fixed by immersion with Bouin fixative for 72 h, embedded in paraffin and serially sectioned. The sections were processed for the immunoperoxidase method using an anti-HRP antibody raised in rabbit in our laboratory. Adjacent sections were immunostained for GFAP.

To trace HRP with the electron microscope, wt and hyh mice at P3 and P30 (Table 1) were injected with the tracer into the left lateral ventricle, as described above. Five minutes after the injection, the animals were transcardially perfused with phosphate buffer containing 2 % paraformaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde. Vibratome sections, 50- μ m thick, were obtained and processed for the histochemical detection of HRP using DAB as the electron donor. The sections were postfixated in 1 % osmium tetroxide (Merck, Darmstadt, Germany) and flat embedded in Araldite 502. Ultrathin sections (60-nm thickness) were stained with lead citrate and studied under an electron microscope.

Lanthanum nitrate tracing at the electron microscope

To demonstrate the presence or absence of tight junctions in the ependymal and astrocyte barriers, lanthanum nitrate was used as a tracer under electron microscope [39, 48]. Wt and hyh mice (Table 1) were anesthetized and transcardially perfused with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, and the brains were dissected out and immersed in fresh fixative for 1 h. After fixation, 2 % lanthanum nitrate in cacodylate buffer, pH 7.8, was delivered over 2 min into one of the lateral ventricles, the cerebral aqueduct or the fourth ventricle. The brains were further fixed in fresh fixative for 24 h at 4 °C. The walls of the cerebral aqueduct, the lateral, third and fourth ventricles, and the choroid plexus were dissected out and postfixated in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 h at 4 °C. The tissue blocks were dehydrated and embedded in Araldite 502 (EMS, Hatfield, PA, USA). Ultrathin sections (60-nm thickness) were slightly stained with uranyl acetate and studied under an electron microscope (Philips CM100). The blood–brain barrier at the choroid plexus and the endothelial cells of the brain capillaries (presence of tight junctions) were used as controls.

Scanning electron microscopy

Killed hyh mice (Table 1) were used. Cold 2.5 % glutaraldehyde in phosphate buffer was injected into a lateral ventricle for 2 min. The brains were further fixed by immersion in the same fixative for 2 h at room temperature. Several areas of the ventricular cavities were dissected out and processed as previously described [30].

Data analysis

Morphometric, densitometric and image analyses were carried out to quantify several parameters. (1) The relative optic density of aquaporin 4 immunoreaction in ependymal cells, astrocyte cell bodies and perivascular endfeet of astrocytes was estimated. (2) The total area occupied by the early endosomal compartment (EEA-1 immunoreactivity) in ependymal cells or astrocytes was quantified. (3) The cell density of GFAP+ astrocytes at specific sites of the abnormal ventricles was estimated using whole mounts of ventricular walls of four hyh P20 mice processed for immunofluorescence for GFAP. (4) The degree of penetration of intraventricularly injected HRP into the brain parenchyma was estimated in sections immunostained using anti-HRP. See Supplementary data for a description of the procedures.

Results

In the description that follows, the morphological phenotype and the barrier properties of the multiciliated ependyma of wt mice will be compared with those of the multiciliated ependyma of hyh mice resisting denudation [41] and, of particular interest for the present study, with those of the astrocyte layer covering the denuded ventricular regions of the hyh mice. Most of this study were carried out at stages from P6 on, when the denudation process and the astrocyte reaction are completed [41] and a severe progressive hydrocephalus develops (Supplementary Fig. 1). After P6, most of the ventricular surface, with the exception of some specific sites, underwent denudation (Supplementary Fig. 2). The denudation sites resisting denudation are the circumventricular organs, the roof of the third ventricle, the roof of the middle region of the cerebral aqueduct and small patches consistently present at very specific sites of the aqueduct and lateral ventricles (Supplementary Fig. 2). All denuded areas presented periventricular astrocyte reactions. However, the description of the results will principally circumscribe to events occurring in the fourth and lateral ventricles. In hyh mice, the lateral ventricles are enormously expanded, whereas the fourth ventricle is not. However, both cavities undergo

ependymal denudation and astrocyte reaction, indicating that such processes are associated with the genetic defect of these mice and not with the ventriculomegaly or increased intraventricular pressure. Therefore, it seemed relevant to compare the properties of the astrocytes lining the denuded areas in the fourth and lateral ventricles.

Cytoskeletal proteins in multiciliated ependyma and astrocytes covering the ventricular walls of wt and hyh mice

In mature wt mice, the multiciliated ependyma formed a single cell layer that was readily recognized by the expression of the S100 β protein (Fig. 1a, e), tubulin β IV (Fig. 1f) and the intermediate filament protein vimentin (Fig. 1h). The ciliated ependyma did not express GFAP (Fig. 1g).

In mature hyh mice, most of the ventricular surface lacked ependyma due to its disruption during development (Fig. 1b, d) [29, 41]. Nevertheless, multiciliated ependymal cells that resisted denudation remained in situ as small patches that were consistently located at specific sites of the ventricular walls (Fig. 1b, d) [29, 41, 65]. In the areas lacking ependyma, astrocytes formed a glial layer that covered the denuded ventricular surface. These cells lacked cilia (Fig. 1j) and expressed the intermediate filament proteins GFAP (Fig. 1k, o, p) and vimentin (Fig. 1l).

Junction proteins in multiciliated ependyma and astrocytes lining the ventricular walls of wt and hyh mice

The junction protein N-cadherin was present at the lateral plasma membrane forming a continuous belt around the apical cell pole of the multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice (Fig. 2d). However, the layer of reactive astrocytes covering the denuded areas did not express N-cadherin (Fig. 2e).

The multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice express connexin 43. This junction protein appeared as supranuclear granules and slender patches (possibly connexons) at the lateral plasma membrane (Fig. 2a, b). In the reactive astrocytes layer, connexin 43 appeared as granules throughout the cytoplasm (Fig. 2c). The older astrocyte layer of P30 mice apparently expressed more connexin 43 than did the P6 mice.

Molecules implicated in transport mechanisms in multiciliated ependyma and astrocytes covering the ventricular walls of wt and hyh mice

In wt mice, the water channel protein aquaporin 4 was detected in the latero-basal cell domains, and less

intensively in the apical domain, of the ependymal cells (Fig. 3a) and in the perivascular endfeet of the astrocytes. Aquaporin 4 was not detected in the cell bodies of the astrocytes. In contrast, in the hyh mouse, aquaporin 4 was found throughout the cell body and in the processes of the astrocytes covering the ependyma-denuded areas (Fig. 3c; Supplementary Fig. 3), as well as in the perivascular endfeet of the parenchymal astrocytes (Fig. 3b). Densitometric analysis showed that in hyh mice, the reactive astrocytes covering the ependyma-denuded surfaces presented a small but significant increase in immunoreactive aquaporin 4 with respect to the ependyma of wt mice (Fig. 3d).

The lateral ventricles of human hydrocephalic foetuses displayed large areas of ependymal denudation that clearly contrasted with those still lined by ciliated ependymal cells (cf. [18]; Fig. 3e–g). The denuded areas were covered by a layer of astrocyte cell bodies and processes (Fig. 3g). In the ependyma, aquaporin 4 outlined the cell profile (Fig. 3h). In the astrocytes, the water channel was present in the cell body and the processes (Fig. 3i, j).

The glucose transporter GLUT1 was weakly expressed in the multiciliated ependyma lining the fourth ventricle of P6 wt mice (Fig. 3k). It was not detectable in the ependyma of P30 wt mice or in the astrocytes covering the ependyma-denuded areas (Fig. 3l). In contrast, the immunoreaction was strong in the endothelial cells of wt and hyh mice (Fig. 3k, l).

The protein caveolin-1 labelled caveolae in a dotted pattern at the plasma membrane and cytoplasm of the multiciliated ependyma of mice (Fig. 3m, n) and of human foetuses (Fig. 3q). Caveolin-1 was detected throughout the cell body and the processes of astrocytes covering the ependyma-denuded areas in hyh mice (Fig. 3o, p) and in human hydrocephalic foetuses (Fig. 3r). This finding is in contrast with the poor or absent immunoreaction found in parenchymal astrocytes.

Endocytosis in multiciliated ependyma and in the astrocyte layer lining the ependyma-denuded regions of hyh mice

Early endosomes, immunodetected by the presence of the EEA1 antigen, were present in the apical juxtannuclear domain of the multiciliated ependymal cells of wt and hyh mice (Fig. 4a, d). The trans-Golgi network was detected in the supranuclear region below the layer of the early endosomes (Fig. 4b). HRP administered in vivo into the lateral ventricle of wt and hyh mice was traced with the electron microscope. In both the normal ependyma of wt mice and the denudation-resistant ependyma of hyh mice, HRP was visualized within small endocytic vesicles and in large irregular compartments that corresponded to early endosomes (Fig. 4c; Supplementary Fig. 4).

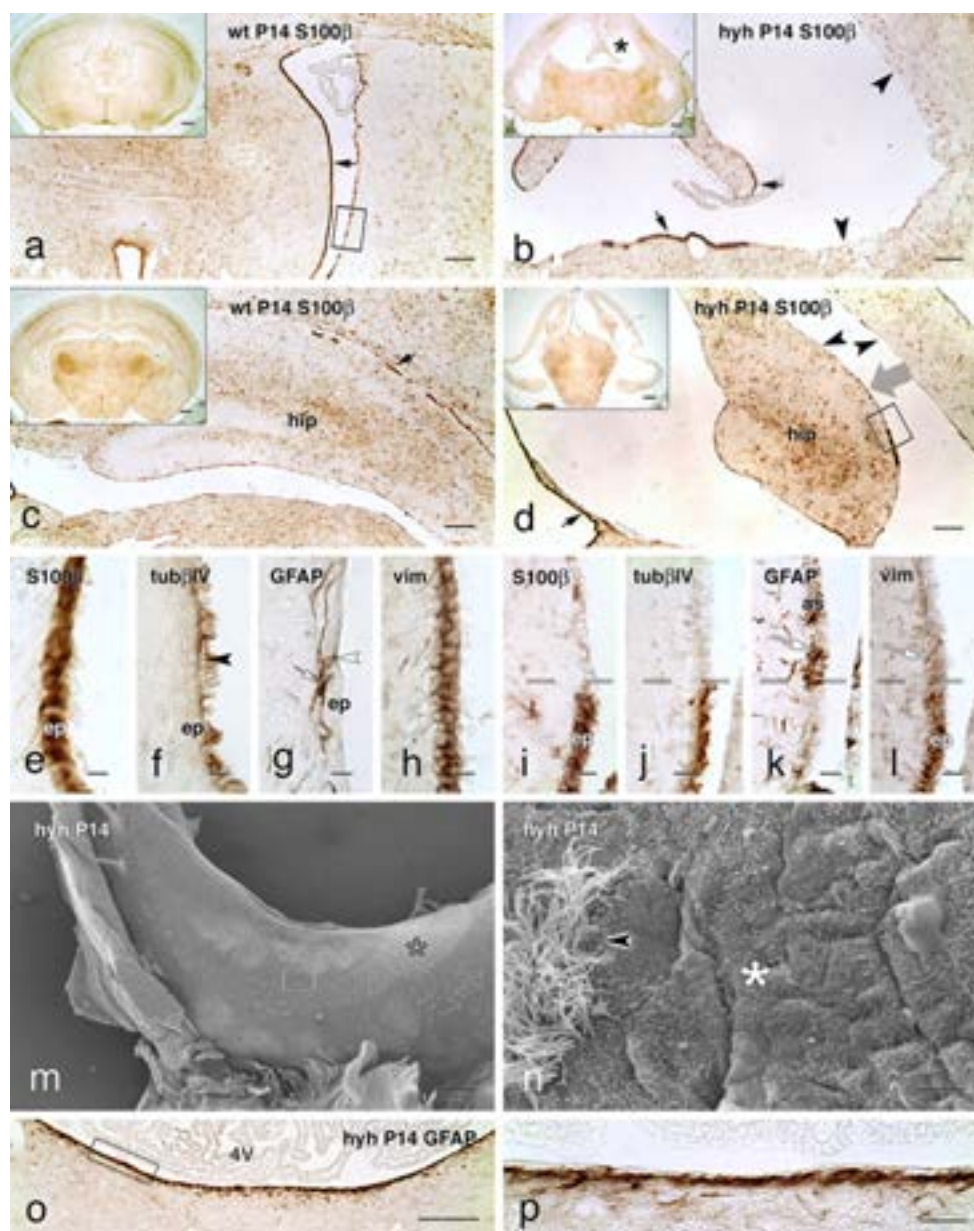


Fig. 1 Expression of S100 β and cytoskeleton proteins in the ependymal cells and astrocytes covering the ventricular surface of wt and hyh mice at P14. Frontal sections of the telencephalon and fourth ventricle (4V) of wt (**a, c, e–h**) and hyh (**b, d, i–l, o, p**) mice immunostained for S100 β protein, tubulin β IV (tub β IV), GFAP and vimentin (vim). **a–d** The ependyma (*ep*) contains S100 β protein (*black arrows*). In the hyh mice, the lateral ventricles are enlarged (*black asterisk*) and most of their surface is devoid of ependyma (*black arrowheads*). The *thick grey arrow* in **d** indicates the direction at which the area framed is shown under the scanning microscope as shown below in this panel. **e–h** Adjacent sections of an area similar to that framed in **a**. Tub β IV is present in ependymal cilia (*black arrowhead* in **f**). In the wt mouse, GFAP $^{+}$ astrocytes (*as*) lying in the subependymal (*white arrow*; in **g**) and ependymal (*white arrowhead*;

in **g**) region are observed. **i–l** Adjacent sections of an area similar to that framed in **d** bordering the hippocampus. The *broken line* in **i–l** denotes the border between an ependymal patch resting denudation (*bottom*) and the astrocyte layer covering the denuded surface (*top*). Reactive astrocytes are GFAP $^{+}$ and vim $^{+}$ (*white arrows*; in **k, l**). **m, n** Scanning electron microscopy of the hippocampus surface overlooking the lateral ventricle (for orientation, see *thick arrow* in **d**). A patch of ciliated ependyma partially covers the ventricle surface (*open asterisk*; in **m**). **n** A detailed view of the framed area in **m**, showing the border between the ependyma (*arrowhead*) and the astrocyte layer (*asterisk*). The area in the fourth ventricle in **o** is shown in **p**. A robust layer of GFAP $^{+}$ astrocytes lines the floor of the denuded ventricle. *Scale bars a–d* 150 μ m, **e–l** 10 μ m, **m** 300 μ m, **n** 5 μ m, **o** 20 μ m, **p** 200 μ m; *insets in a–d* 500 μ m

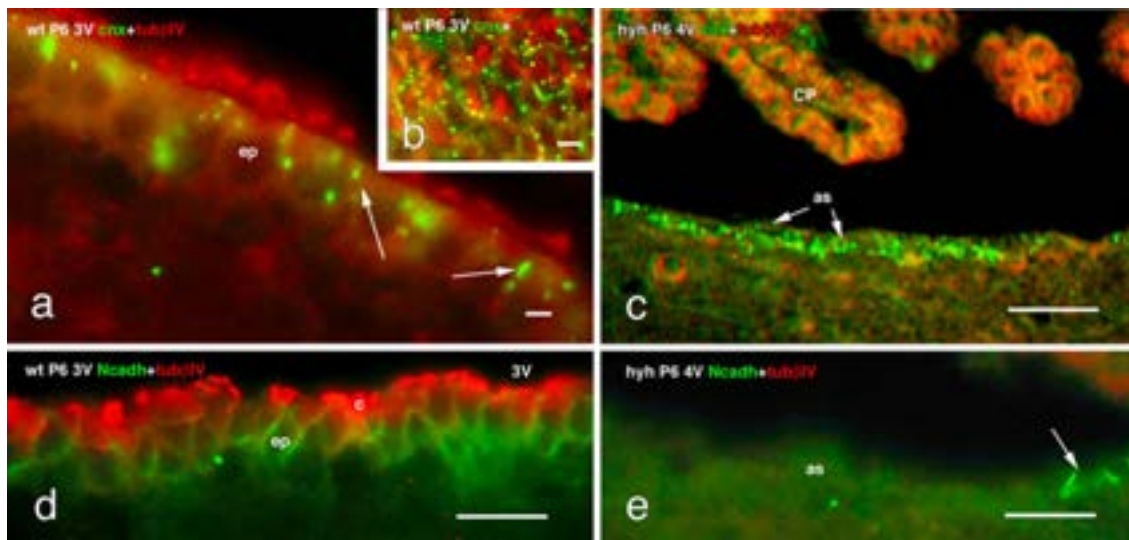


Fig. 2 Expression of junction proteins in the cell lining the floor of the fourth ventricle of wt and hyh mice at P6. **a–c** Double immunofluorescence for tubulin β IV (*tub β IV*, red) and connexin 43 (*cnx*, green). **a** The multiciliated ependyma (*ep*) in wt mice present *cnx*+ spots localized preferentially at the apical cell pole of ependymal cells (*arrows*). **b** Tangential section through the apical cell poles of the ependyma showing the distribution of *cnx* as *dots* in the lateral plasma membrane. **c** The astrocyte layer (*as*) lining the

denuded ventricle in the hyh mouse expresses *cnx* (*arrow*) but not *tub β IV*. **d, e** Double immunofluorescence for *tub β IV* (red) and N-cadherin (*Ncadh*, green). **d** The ependyma in wt mice shows the belt-like distribution of *Ncadh*. **e** The astrocytes lining the denuded ventricles do not express *Ncadh*. *Arrow* points to a few ependymal cells remaining in situ and expressing *Ncadh*. 3V third ventricle, 4V fourth ventricle, *c* cilia, *CP* choroid plexus. Scale bars **a** 6 μ m, **b** 8 μ m, **c** 40 μ m, **d** 12 μ m, **e** 12 μ m

At variance with the parenchymal astrocytes, the astrocytes covering the ependyma-denuded areas of hyh mice displayed numerous EEA1-positive endosomes scattered throughout the cell body and processes (Fig. 4d, f). In these astrocytes, the cytoplasm area occupied by the early endosomes was not significantly different from that of the ependymal cells of wt mice (Fig. 4e); the trans-Golgi network was located in a cytoplasmic region that was close to the ventricle (Supplementary Fig. 5) and along the processes (Fig. 4g). HRP administered in vivo to hyh mice was incorporated into small endocytic vesicles and early endosomes of astrocytes covering denuded areas (Fig. 4j, k; Supplementary Fig. 4).

The ependyma of the lateral ventricles of human hydrocephalic fetuses displayed a strong EEA1 immunoreactivity in the supranuclear cytoplasm (Fig. 4h). The cell body and processes of the astrocytes lining the adjacent denuded areas were strongly reactive with anti-EEA1 (Fig. 4i).

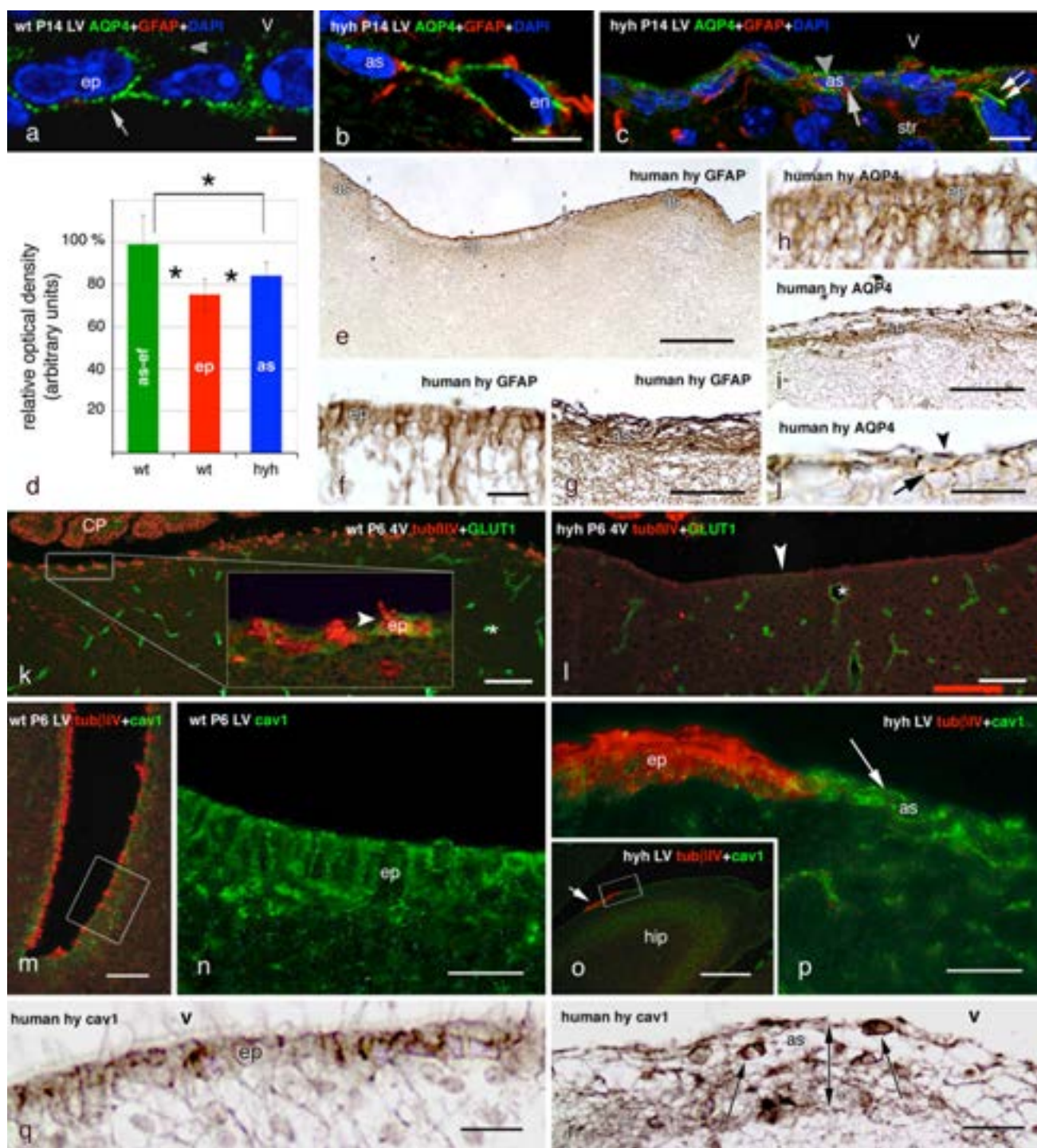
Paracellular routes of transport in ependyma of wt mice and astrocytes covering ependyma-denuded areas in hyh mice

On electron microscope, the lateral plasma membranes of neighbouring ependymal cells were found to be extensively

interdigitated (Fig. 5a; Supplementary Fig. 4) and joined together by adherents and gap junctions; tight junctions were missing. Lanthanum applied to the ventricular surface penetrated through the labyrinth of extracellular spaces, filled the intercellular space of the underlying neuropile and labelled the basement membrane of the capillaries and the intercellular space of the endothelium up to the tight junctions joining the endothelial cells (Supplementary Fig. 5). Lanthanum tracing further supported the absence of tight junctions at the multiciliated ependymal lining.

Electron microscope analysis revealed that astrocytes projected into the ventricle numerous, irregularly shaped, microvilli; cilia were missing (Figs. 1m, n, 5b). These cells displayed numerous sheet-like processes that interdigitated extensively with those of adjacent cells, forming a dense subventricular network of astrocyte processes (Fig. 5b; see Supplementary Fig. 5) that was readily visualized with GFAP immunocytochemistry (Fig. 1k, p). The surface astrocytes were joined together by gap junctions (Fig. 5b) and lacked zonula adherens and tight junctions (Fig. 5b; Supplementary Figs. 4 and 5).

In hyh mice, the astrocyte layer covering the denuded brain ventricles showed regional differences. The astrocytes formed a cell layer with varying degrees of tightness that ranged from loose to compact. In the latero-medial wall of the lateral ventricles lining the hippocampus and



striatum (Figs. 1k, 6a, b, g), the third ventricle, the ventral wall of the cerebral aqueduct and the fourth ventricle (Fig. 1o, p), the denuded surface was lined by densely packed astrocytes. In other denuded areas, such as those of the dorsal and external walls of the lateral ventricles, reactive astrocytes were arranged as a loose cell layer (Fig. 6c–e). The different degrees of cell density of the

astrocyte assembled at the denuded areas became most evident in whole mount preparations of different ventricular regions immunostained for GFAP (Fig. 6a–d) and used for a densitometric analysis (Fig. 6f). This study led to identify three types of astrocyte arrangements: (1) compact, characterized by a continuous layer of tightly packed astrocytes (Figs. 1o, p, 2c, 4b, 6a, b); (2) loose, recognized

Fig. 3 Expression of aquaporin 4, the glucose transporter 1 (GLUT1) and caveolin-1 in the ependyma of wt mice and in the astrocyte layer that covers the ependymal-denuded surface in hyh mice and a human hydrocephalic foetus. **a** Immunolabelling for aquaporin 4 (*AQP4*, green) in the ependyma (*ep*) of the lateral ventricle (*LV*) of a wt mouse; DAPI counterstaining (blue). The water channel is mainly located in the baso-lateral plasma membrane domain (arrow), but there is also a weak reaction at the apical domain (arrowhead). **b, c** Latero-medial wall of a hyh mouse with double immunofluorescence for GFAP (red), AQP4 (green) and DAPI counterstaining (blue). AQP4 immunoreaction is present in a perivascular astrocyte (*as*) and its endfeet surrounding endothelial (*en*) cells (**b**). Reactive astrocytes present AQP4 at the apical (arrowhead) and basal (arrow) cytoplasm and in their cell processes (double arrow) (**c**). **d** Optical density of the immunoreaction for AQP4 was recorded at (1) the ependyma (*ep*) of the latero-medial wall of the lateral ventricles of wt mice; (2) the cell layer of reactive astrocytes lining denuded areas of the latero-medial wall of the lateral ventricles of hyh mice (*as*); (3) the perivascular endfeet of the astrocytes (*as-ef*) of wt mice. Data represent the mean and standard deviation from four wt and four hyh mice (3–4 sections each mouse; four neighbour areas from each section). Data are expressed as relative percentage of the values obtained in each section where the mean of *as-ef* in wt mice was considered to be 100%. *Correlation analysis showed significant differences ($p < 0.001$, Student's *t* test). **e–j** Lateral ventricle of a 40-week-old human hydrocephalic foetus. Immunostaining for GFAP (**e–g**) and AQP4 (**h–j**). **e** Low power view showing ependyma not yet disrupted (*ep*) and denuded areas lined by a layer of GFAP+ astrocytes (*as*). These two regions are shown at higher magnification in **f** and **g**. The ependyma (**h**) and the astrocyte layer (**i, j**) express AQP4. **k, l** Fourth ventricle (*4V*) with double immunofluorescence for tubulin β IV (*tub β IV*, red) and GLUT1 (green). Endothelial cells (*asterisks*) are reactive to GLUT1. **k** The inset shows a weak reaction for GLUT1 in the ependyma lining the floor of the fourth ventricle of a P6 wt mouse. **l** The astrocyte layer lining the denuded floor of the fourth ventricle of hyh mice does not express GLUT1. **m** Lateral ventricle of a wt P6 mouse. Double immunofluorescence for tubulin β IV (red) and caveolin-1 (*cav1*, green). The framed area is shown in **n** using only the *cav1* channel. **n** Detailed view of area framed in **m**, showing the strong expression of *cav1* in the multiciliated ependyma of the lateral ventricle. **o** Wall of the lateral ventricle close to the hippocampus (*hip*) of a P6 hyh mouse. Double immunofluorescence for tubulin β IV (red) and *cav1* (green). The walls are denuded with the exception of a tubulin β IV+ resistant ependymal patch (arrow). The area framed is shown in **p**. **p** Astrocytes lining the denuded areas of the lateral ventricle strongly express *cav1* (arrow). The patch of ependyma is strongly labelled for tubulin β IV (red), whereas the astrocyte layer is not. **q, r** Lateral ventricle of a 40-week-old hydrocephalic human foetus. Section adjacent to that shown in **f** and **g**, immunostained for *cav1*. The cell body of ependymal cells contains immunoreactive granules (**q**). The cell body (arrows) and processes of the astrocytes forming the thick cell layer lining denuded areas (double-ended arrow) are immunoreactive (**r**). *CP* choroid plexus, *V* ventricle lumen. Scale bars **a** 5 μ m, **b, c** 10 μ m, **e** 200 μ m, **f, h, j** 20 μ m, **g** 50 μ m, **i** 50 μ m, **k, o** 100 μ m, **l** 80 μ m, **m** 40 μ m, **n, p** 20 μ m

by a continuous layer of astrocytes separated by wide intercellular spaces (Fig. 6c–e); (3) very loose, characterized by a discontinuous layer of astrocytes (Fig. 6c, inset).

The barrier property, in terms of paracellular permeability, for these different types of astrocyte arrangements located at distinct regions of the ventricular system was

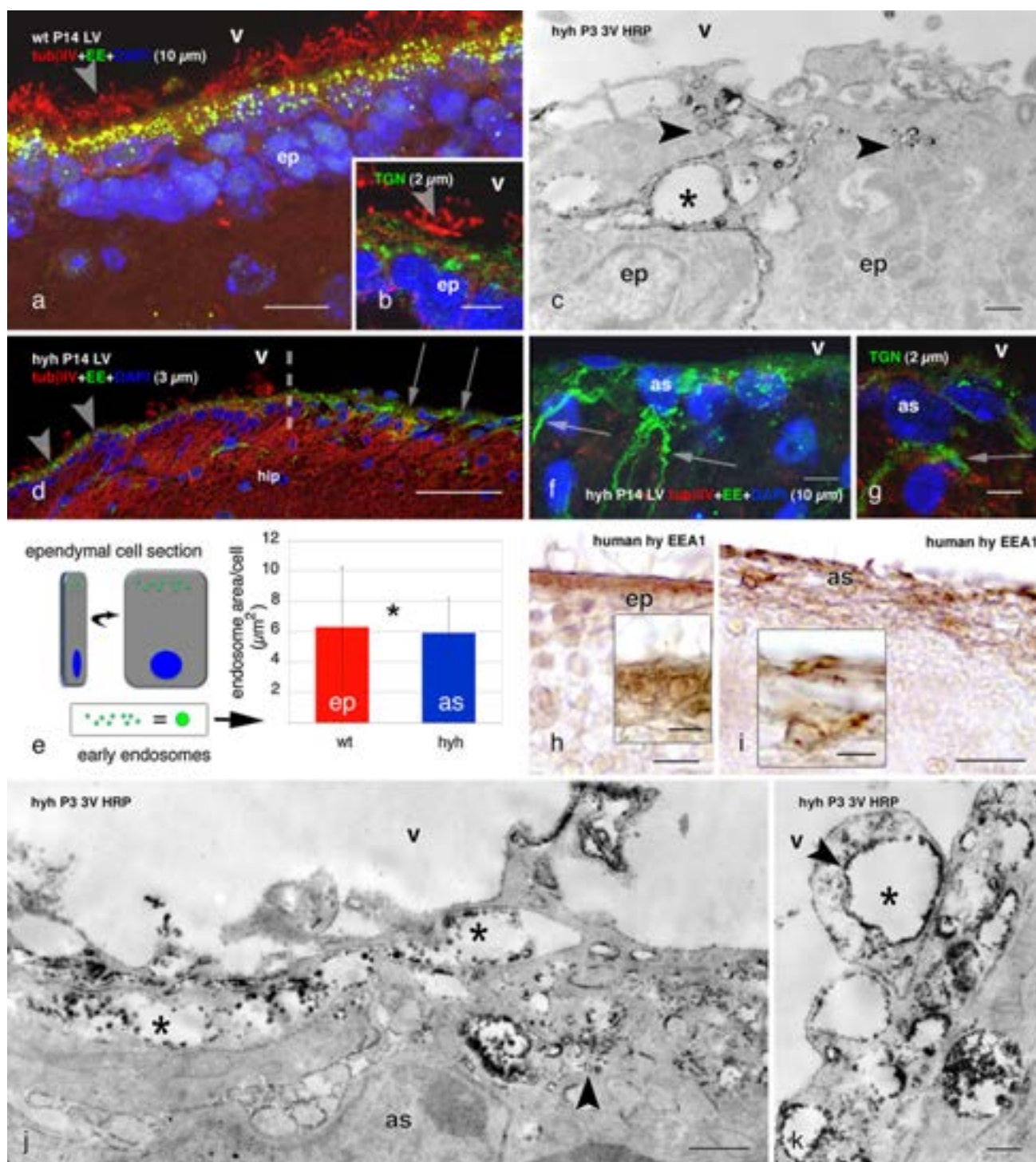
tested by in vivo administration of HRP. Five minutes after HRP injection into a lateral ventricle of hyh mice, the tracer was incorporated by the dense astrocytic layer and penetrated about 20 μ m into the underlying neuropile, resembling the barrier property of the neighbouring patch of multiciliated ependyma (Fig. 6h–l). In the areas that displayed loosely arranged astrocytes, HRP penetrated about 90 μ m into the brain parenchyma (Fig. 6g, h), indicating a rather free movement of HRP at this level.

Discussion

In hyh hydrocephalic mice, there is a programme of neuroepithelium/ependyma denudation starting early in foetal life and ending by the end of the first postnatal week; the missing ependyma is replaced by a layer of astrocytes forming a new interface between the CSF and the brain parenchyma [29, 41, 65]. This phenomenon has also been described in human hydrocephalic fetuses [18, 53, 55]. The present study, carried out in hyh mice and human cases, has revealed that the new surface layer of astrocytes shares some phenotypic and functional features with the ependyma [summarized in Table 3], suggesting that such a unique astrocyte reaction may represent an attempt to re-establish some lost functions at the brain parenchyma–CSF interface.

The astrocytes covering the denuded ventricular walls of hydrocephalic hyh mice form a new cell layer with a cell organization that resembles the ependyma

The astrocytes found at the denuded ventricular walls form a new cell layer that in several aspects resembles the ependyma; i.e. it expresses vimentin, lacks tight junctions, displays connexin 43-based gap junctions, projects numerous microvilli to the ventricle and displays numerous lateral interdigitations that result in a winding intercellular space (Fig. 7). The existence of gap junctions between ependymal cells has been widely demonstrated [6, 8, 9, 21, 28], and they are believed to play a role in the synchronization of cilia beating [50, 55]. Their functional significance in the astrocyte layer is unknown; they could be associated with electrical and metabolic activities, the determination of cell phenotype [45], or the clearance of cytotoxic molecules and the spreading of neuroprotective factors that takes place in brain injuries, ischaemia and hypoxia [27, 33, 37, 51, 58, 60]. Whatever the functional significance of the gap junctions connecting the astrocytes covering the denuded ventricular surface, it may be suggested that these cells are coupled to play a function as a CSF–brain barrier involved in water and solute transport (Fig. 7).



The ependyma and the astrocyte cell layer present active endocytic mechanisms

Ependymal cells incorporate CSF proteins into the pinocytotic-lysosome pathway [14]. The multiciliated ependyma of wt mice and the denudation-resistant ependyma of hyh

mice express caveolin-1, which is in agreement with the expression of EEA1 antigen, a reliable marker of early endosomes, in these cells (present report). Early endosomes are dynamic cell compartments that are involved in endocytosis and sorting mechanisms [32, 67]. Caveolin-1 is a protein that is present in caveolae, structures that play a

◀ **Fig. 4** Endocytosis of HRP injected in vivo into the lateral ventricle of wt and hyh mice, and location of endocytic vesicles, early endosomes and the Golgi apparatus. Lateral ventricle of wt (**a, b**) and hyh (**d, f, g**) mice, at P14. Confocal laser microscopy of immunolabelling for the EEA1 antigen of early endosomes (EE, green in **a, d, f**), the trans-Golgi network (TGN, green in **b, g**) and tubulin β IV (tub β IV, red). DAPI nuclear staining (blue). Z-projections comprising confocal planes for different thicknesses (between brackets). Numerous EE are present in the apical pole (arrowheads in **a, d**) of the ependymal cells (ep) in wt and hyh mice. The broken line in **d** shows the border between a patch of intact ependyma (arrowheads) and the astrocyte layer covering an ependyma-denuded surface (arrows) in the hippocampus (hip). The TGN in ependymal cells is located juxtannuclear (arrowhead in **b**). In the astrocytes (as) covering the ependyma-denuded surface of hyh mice (arrows in **d**), abundant EE and TGN are present in the cell bodies and processes (arrows in **f** and **g**). **e** Total area occupied by EEA1-reactive EE per ependymal cell of wt mice and per reactive astrocyte (as) of hyh mice in confocal laser cuts of frozen sections (explanation on the left side of the figure). Data represent the mean and standard deviation obtained from sections corresponding to four wt and four hyh mice (4 sections each mouse). *Correlation analysis did not show a significant difference ($p = 0.695$, Student's t test). **c, j, k** Ultrastructural detection in the third ventricle (3V) wall of HRP injected into a lateral ventricle at P3 in wt mice (**c**) and hyh mice (**h, i**). In the apical pole of ependymal cells and in astrocytes, HRP is located within endocytic vesicles (arrowheads) and large EE (asterisks). **h, i** Lateral ventricle of a 40-week-old human hydrocephalic foetus. Section adjacent to that shown in Fig. 3f, g, immunostained for EEA1. The cell body of ependymal cells (ep) contains immunoreactive granules (**h**). The cell body and processes of the astrocytes forming the thick cells layer lining denuded areas are immunoreactive (**i**). LV lateral ventricle, str striatum, V ventricle lumen. Scale bars **a** 10 μ m, **b, g** 5 μ m, **c, j** 400 nm, **d** 50 μ m, **f** 7 μ m, **h, i** 20 μ m; Insets in **h, i** 10 μ m, **k** 200 nm

role in endocytosis and transcytosis [20, 23]; caveolin is also present in both the ependyma [44, 50, present report] and the reactive astrocytes [present study]. Although most

cargo that is endocytosed via caveolae is fluid, certain compounds enter into caveolae via specific receptors [62]. The presence of caveolae in the ependyma is in agreement with the known capacity of ependymal cells to incorporate tracer molecules present in the CSF [8, 10]. In the reactive astrocytes, caveolae can play a similar role, which is in agreement with the existence of endocytosis and sorting mechanisms [32, 67], which have also been experimentally tested in the present study by injecting HRP into the CSF of living mice. At variance with the ependyma, the non-polarized distribution of caveolae and endosomes in the reactive astrocytes indicate that they can incorporate fluid and substances not only from the ventricle but also from the parenchymal fluid (Fig. 7).

Role of the expression of the water channel protein aquaporin 4 in the ependyma and in the new astrocyte cell barrier

Aquaporin 4 is a water channel with marked prevalence in periventricular areas [63]. In the ependymal cells, it is located in the latero-basal domains [46, present report] and, less extensively, in the apical domain (present report). In parenchymal astrocytes, it is mostly found in the vascular endfeet [46, present report]. At variance, reactive astrocytes lining the denuded ependyma in hydrocephalic mice and human fetuses overexpress aquaporin 4, and this protein is found throughout the cell body and processes (Fig. 7). The presence of aquaporin 4 in parenchymal reactive astrocytes has been proposed to be involved in the water entry to astrocytes in initial stages of oedema formation [38] to re-establish the osmotic equilibrium [64]. The periventricular reaction found in the present report,

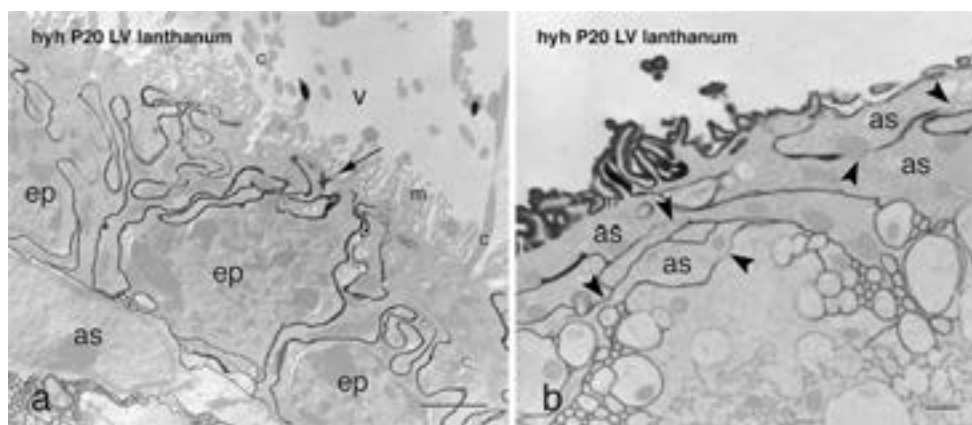
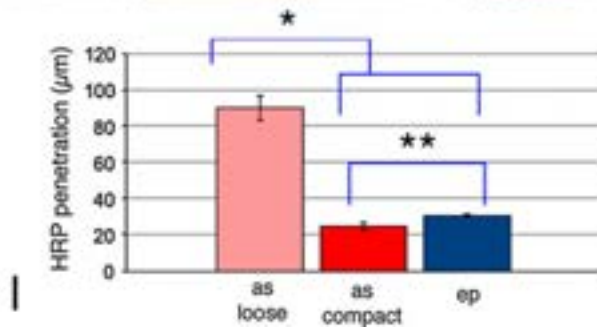
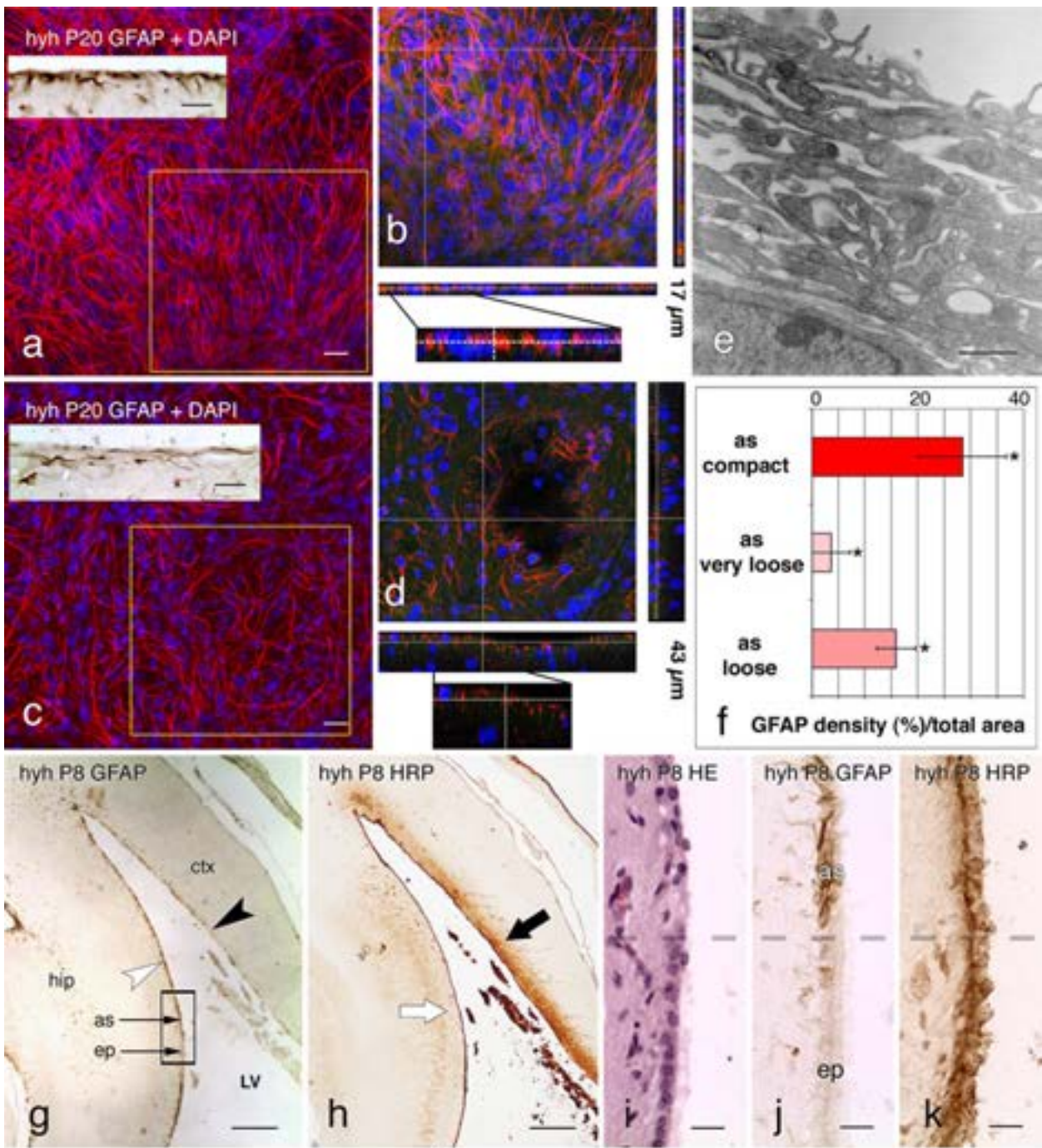


Fig. 5 Ultrastructural detection of lanthanum nitrate applied into the lateral ventricle of a P20 hyh mouse. **a** Lanthanum penetrates from the ventricular lumen (V, arrow) towards the brain parenchyma through the winding extracellular spaces of the denudation-resistant, ciliated ependyma (ep). **b** In the astrocytic layer (as) lining the

denuded ventricular surface of a hyh mouse, the tracer penetrates through the extracellular spaces and bypasses the gap junctions joining the astrocytes (arrowheads). **c** cilia, LV lateral ventricle, **m** microvilli. Scale bars **a** 2 μ m, **b** 500 nm



◀ **Fig. 6** Tightness and permeability of the layer of astrocytes lining different denuded regions of the lateral ventricle of hyh mice. **a–d** Hyh mice at P20. Surface views obtained from whole mount preparations of ventricular walls processed for GFAP (red) immunofluorescence and DAPI nuclear staining. The astrocyte cell density in the latero-medial wall of the lateral ventricle (**a, b**) is much higher than that of the latero-external wall of the lateral ventricle (**c, d**; for orientation, see **g**). **b, d** 1 μm confocal planes of the areas framed in **a** and **b** displaying pseudo 3D reconstructions (17 μm in **b**, 43 μm in **d**) bring out the differential arrangement of the astrocytes. *Insets* in **a, c** immunocytochemistry for GFAP in sections of similar areas. **e** Ultrastructure of the latero-external wall of a lateral ventricle of a hyh mouse at P20 showing the loose organization of astrocytes. **f** Measurement of astrocyte (*as*) cell densities using whole mount preparations of regions of the lateral ventricle displaying compact (latero-medial wall, see **a**), loose (see **c**) or very loose (latero-external walls) arrangements of astrocytes. Data represent mean and standard deviation of the percentage of the area occupied by the GFAP-immunoreactive profiles with respect to the total area. Data were collected from four hyh mice, four with whole mounts/mouse/each location. *Correlation analysis showed significant differences between the three types of astrocyte organization ($p < 0.001$, Student's *t* test). **g** Frontal section through the telencephalon of a hyh mouse at P8 immunostained for GFAP. The latero-medial wall of the lateral ventricle is covered by an astrocytic layer (*as*; white arrowhead) and a few patches of ependyma (*ep*). The area framed is shown in **i–k**. The latero-external wall of the lateral ventricle contains a discontinuous astrocytic layer and scattered ependymal cells (black arrowhead). **h** Adjacent section to that shown in **g**, immunostained using anti-HRP to visualize the HRP injected in vivo into a lateral ventricle. In the latero-medial wall of the ventricle, the tracer is incorporated equally by the layer of astrocytes and the patch of ependyma (white arrow). In the latero-external wall of the ventricle, HRP penetrates deeply into the brain parenchyma (black arrow). **i–k** Adjacent serial sections through an area similar to that framed in **g**, including a patch of ependyma lying close to a denuded area lined by an astrocytic layer. The broken line points to the border between both areas. Haematoxylin–eosin staining (**i**), anti-GFAP (**j**) and anti-HRP (**k**) immunolabelling. The astrocyte layer and the ependymal patch incorporate HRP following a similar pattern. **l** Measurement of the penetration of intraventricularly injected HRP into the brain parenchyma at three different regions of the lateral ventricles: with ependyma (**j, k**), compact layer of reactive astrocyte (white arrow/arrowhead in **g, h**) and loose layer of astrocytes (black arrow/arrowhead in **g, h**). Data represent mean and standard deviations from four hyh P8 mice (4 measurements in 3–4 sections from each mouse). *The correlation analysis showed a significant difference between the degree of penetration of HRP through the loose astrocyte layer and that of the other two regions ($p < 0.001$, Student's *t* test). **There was not a significant difference between the data from the penetration through the astrocyte compact organization and the ependyma in the hippocampus of hyh mice ($p = 1.119$, Student's *t* test). *ctx* cerebral cortex, *hip* hippocampus, *LV* lateral ventricle. Scale bars **a, c insets** in **a** and **c** 20 μm , **e** 1 μm , **g, h** 200 μm , **i–k** 20 μm

both in mice and humans, could represent an attempt to re-establish the equilibrium between the ventricular and parenchymal fluids, or to help CSF transport from ventricles to brain capillaries (Fig. 7). Ependymal aquaporin 4 has been proposed to play a protective role in hydrocephalus by allowing for the transependymal re-absorption of

CSF into brain capillaries [56]. The presence of aquaporin 4 in the apical plasma membrane of ependymal cells supports this possibility. It appears that aquaporin 4 may have a relevant role in hydrocephalus and be a useful therapeutic target [34, 54; reviewed by 40, 42, 56].

The astrocyte layer and the ependyma present similar paracellular routes of transport

The multiciliated ependyma is an epithelial-like layer interposed between the CSF and the brain parenchyma. Although it does not behave like a tight barrier [8, 9], it seems to regulate the transport of ions, small molecules and water [12, 66]. Tight junctions are absent or poorly developed in the mature multiciliated ependyma [8, 12]. Lanthanum nitrate injected into the ventricle of wt and hyh mice further proves that the extracellular spaces of both, the ependyma and astrocyte cell layer, are not sealed (Fig. 7). Furthermore, the ependymal and glial barriers responded similarly to the in vivo intraventricular injection of HRP; the tracer moved through the intercellular space of both barriers and penetrated only a few micrometres into the underlying neuropile, suggesting that both barriers somehow limited the amount of HRP moving from the CSF to the brain parenchyma. This possibility is supported by the finding that HRP penetrated deeply into the brain parenchyma in the regions of the ventricular walls with a poorly developed astrocyte cell layer.

Different and distinct regions of the denuded ventricular walls trigger different astrocyte reactions that lead to glial layers with different degrees of cell density and tightness. What are the signals mediating these different responses? In hyh mice, ependymal denudation takes place at prenatal stages prior to detectable hydrocephalus [30]. Therefore, intraventricular pressure or expanding ventricles cannot be considered to be responsible for the absence of ependyma in these mice. Similarly, the periventricular astrocyte reaction appears shortly after denudation, when astrogliogenesis takes place but at a stage when ventriculomegaly is just starting to develop. Furthermore, the most robust astrocyte layer is that lining the denuded floor of the fourth ventricle, a cavity displaying no dilatation. The mechanism underlying the formation of the astrocyte layer replacing the lost ependyma is not known. Is the actual absence of the ependyma, or the direct exposure of the neuropile to the CSF, or a mechanical effect of the expanding ventricles involved? Are there different physiopathological consequences for brain regions protected by a new and compact layer of astrocytes and those close to a ventricular wall lined by a loose and highly permeable layer of astrocytes? These are open questions for future investigations.

Table 3 Summary of results displaying the presence (+) or absence (–) of the structural and functional markers in the hyh mouse

	Cytoskeleton	Gap junctions (connexin 43)	Adherens junctions (N-cadherin)	Microvilli	Glucose transport (GLUT1)	Water transport (aquaporin 4)	Endocytosis/transcytosis (caveolae containing caveolin 1)	Endocytosis/transcytosis (endosomes containing EEA1 antigen)	Endocytosis/transcytosis (HRP uptake)	Absence of tight junctions/paracellular permeability (lanthanum tracing)
Ependyma	(GFAP) ^a Vimentin	+	+	+	± ^b	+	+	+	+	+
Cell layer of reactive astrocytes	GFAP, vimentin	+	–	+	–	+	+	+	+	+

Findings in bold have been also obtained in human foetuses

^a At variance with mouse ependyma, the ependyma of human foetus is reactive with anti-GFAP

^b GLUT1 is only present in immature ependymal cells

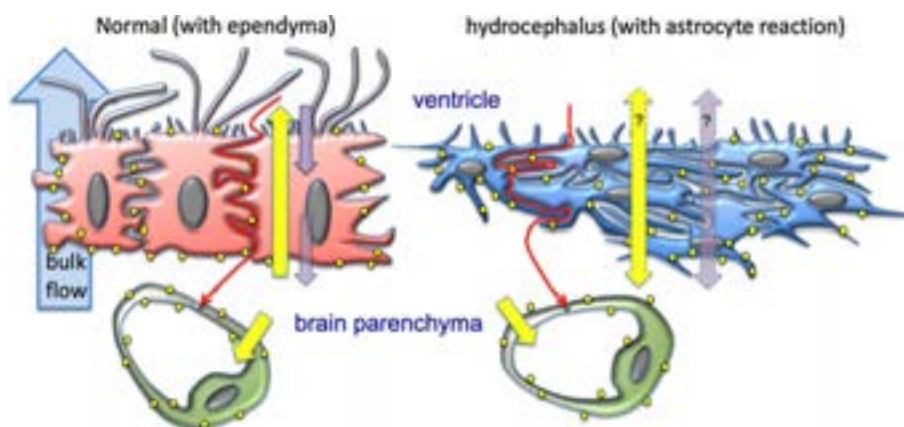


Fig. 7 Schematic representation of the transcellular and paracellular transport mechanisms that would operate at the ependyma and the layer of reactive astrocytes. In the ependymal cells of wt mice (*left*), most of the aquaporin 4 (*yellow dots*) is located at the basolateral domains (some is found at the apical domain), suggesting that the ependyma transports water from the brain parenchyma (*bottom*) towards the ventricular CSF (*upper*) (*yellow arrow* across the ependyma). There are pinocytotic processes and transcytosis directed in the opposite direction through this barrier (*purple arrow*). In hyh mouse (*right*), a layer of reactive astrocytes cover the ependyma-

denuded surfaces. These cells express aquaporin 4 throughout the cell body and processes (*yellow dots*) and could be involved in water transport from or to the CSF (*double-headed yellow arrow*). The pinocytotic processes in the astrocytes could also operate in both directions (*double head purple arrows*). In addition, as in the normal situation, parenchymal astrocytes together with the endothelial cells would be involved in an aquaporin 4-mediated transport towards the brain capillaries. Both barriers would transport molecules from the CSF to the brain parenchyma through a paracellular route (*winding red arrows*)

Acknowledgments The authors wish to thank Dr. Conrad Johanson for critical reading of the manuscript and David Navas, Gregorio Martín, Adolfo Martínez and Manuela Vega from the University of Malaga (Spain), Raquel Ruiz from CESUR (Malaga, Spain) and Genaro Alvia from Austral University of Chile for their valuable technical support. Supported by Grants PS09/0376 from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and PCI2006-A/-0669 from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to AJJ, and 1070241 and 1111018 from Fondecyt (Chile) to EMR.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Abouhamed M, Grobe K, San IV et al (2009) Myosin IXa regulates epithelial differentiation and its deficiency results in hydrocephalus. *Mol Biol Cell* 20:5074–5085
2. Baas D, Meiniel A, Benadiba C et al (2006) A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 24:1020–1030
3. Banizs B, Pike MM, Millican CL et al (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132:5329–5339
4. Bátiz LF, Jiménez A, Guerra M et al (2011) New ependymal cells are originated postnatally in discrete regions of the mouse brain

- and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 121:721–735
5. Bätz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM et al (2009) A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 23:281–290
 6. Bouillé C, Mesnil M, Barriere H, Gabrion J (1991) Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* 4:25–36
 7. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res* 94:367–379
 8. Brightman MW (1965) The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. *J Cell Biol* 26:99–123
 9. Brightman MW (1965) The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution. *Am J Anat* 117:193–220
 10. Brightman MW (1968) The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog Brain Res* 29:19–40
 11. Bronson RT, Lane PW (1990) Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Dev Brain Res* 54:131–136
 12. Bruni JE (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41:2–13
 13. Chae TH, Kim S, Marz KE et al (2004) The hyh mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36:264–270
 14. Del Bigio MR (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:405–406
 15. Del Bigio MR (2000) Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol* 59:946–954
 16. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T (2003) Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 53:337–346
 17. Del Bigio MR, Zhang YW (1998) Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus. *Exp Neurol* 154:157–169
 18. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ et al (2005) Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:595–604
 19. Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes: implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15–36
 20. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP (2003) Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1161–1168
 21. Gabrion JB, Herbuté S, Bouillé C et al (1998) Ependymal and choroidal cells in culture: characterization and functional differentiation. *Microsc Res Tech* 41:124–157
 22. Giaume C, Kirchhoff F, Matute C et al (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324–1335
 23. Gosens R, Mutawe M, Martin S et al (2008) Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med* 8:741–753
 24. Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML et al (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233–243
 25. Hong HK, Chakravarti A, Takahashi JS (2004) The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(6):1748–1753
 26. Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M et al (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet* 13:2133–2141
 27. Jäderstad J, Brismar H, Herlenius E (2010) Hypoxic preconditioning increases gap-junctional graft and host communication. *NeuroReport* 21:1126–1132
 28. Jarvis CR, Andrew RD (1988) Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* 8:3691–3702
 29. Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA et al (2009) Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1006–1020
 30. Jiménez AJ, Tomé M, Páez P et al (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1105–1119
 31. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM et al (2008) Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:10
 32. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* 25:99–112
 33. Lin JH, Weigel H, Cotrina ML et al (1998) Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494–500
 34. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR (2006) Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* 23:2929–2936
 35. McAllister JP, Miller JM (2010) Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:7
 36. Miller JM, McAllister JP (2007) Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 4:5
 37. Nakase T, Yoshida Y, Nagata K (2006) Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54:369–375
 38. Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP (2008) Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia* 56:895–902
 39. Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A et al (2006) A modified technique for the impregnation of lanthanum tracer to study the integrity of tight junctions on cells grown on a permeable substrate. *Microsc Res Tech* 69:776–783
 40. Owlser BK, Pitham T, Wang D (2010) Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:15
 41. Páez P, Bätz LF, Roales-Buján R et al (2007) Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1082–1092
 42. Paul L, Madan M, Rammling M et al (2011) Expression of aquaporin 1 and 4 in congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* 68:462–473
 43. Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM et al (2001) Sub-commissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52:591–607
 44. Peruzzo B, Pastor FE, Blázquez JL et al (2004) Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res* 317:147–164
 45. Ransom BR, Ye ZC (2005) Gap junctions and hemichannels. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, pp 177–189
 46. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS et al (1998) Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11981–11986
 47. Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S et al (2008) Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes migration. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1649–1653

48. Revel JP, Karnovsky MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33:C7–C12
49. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A et al (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570–577
50. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31:757–776
51. Rouach N, Avignone E, Mème W et al (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457–475
52. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T et al (2002) RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15194–15199
53. Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:1–15
54. Shen XQ, Miyajima M, Ogino I et al (2006) Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg* 105:459–464
55. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WF et al (2011) Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol* 21:163–179
56. Skjolding AD, Rowland IJ, Sjøgaard LV et al (2010) Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal Fluid Res* 7:20
57. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC et al (1999) Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 155:109–117
58. Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400–407
59. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35
60. Talhouk RS, Zeinieh MP, Mikati MA, El-Sabban ME (2008) Gap junctional intercellular communication in hypoxia–ischemia-induced neuronal injury. *Prog Neurobiol* 84:57–76
61. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M et al (2010) Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci* 13:700–707
62. Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83:871–932
63. Venero JL, Vizuet ML, Machado A, Cano J (2001) Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63:321–336
64. Vizuet ML, Venero JL, Vargas C et al (1999) Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis* 6:245–258
65. Wagner C, Batiz LF, Rodríguez S et al (2003) Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1019–1040
66. Wang HW, Amin MS, El-Shahat E et al (2010) Effects of central sodium on epithelial sodium channels in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R222–R233
67. Weisz OA, Rodriguez-Boulan E (2009) Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122:4253–4266
68. Worthington WC Jr, Cathcart RS (1963) Ependymal cilia: distribution and activity in the adult human brain. *Science* 139:221–222
69. Yamadori T, Nara K (1979) The directions of ciliary beat on the wall of the lateral ventricle and the currents of the cerebrospinal fluid in the brain ventricles. *Scan Electron Microsc* 3:335–340

A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus*

Esteban M. Rodríguez¹, María M. Guerra¹, Karin Vío¹, César González¹, Alexander Ortloff¹, Luis F. Bátiz¹, Sara Rodríguez¹, María C. Jara¹, Rosa I. Muñoz¹, Eduardo Ortega², Jaime Jaque², Francisco Guerra³, Deborah A. Sival⁴, Wilfred F. A. den Dunnen⁴, Antonio J. Jiménez⁵, María D. Domínguez-Pinos⁵, José M. Pérez-Fígares⁵, James P. McAllister⁶, Conrad Johanson⁷

¹ Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

² Instituto de Neurociencias Clínicas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³ Instituto de Obstetricia y Ginecología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

⁴ Departments of Pediatric Neurology y Pediatrics, University Medical Center, University of Groningen, The Netherlands.

⁵ Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Spain

⁶ Department of Neurosurgery, Pediatric Neurosurgery Division, University of Utah, UT, USA.

⁷ Department of Neurosurgery, Alpert Medical School at Brown University, NY, USA.

ABSTRACT

Most cells of the developing mammalian brain derive from the ventricular (VZ) and the subventricular (SVZ) zones. The VZ is formed by the multipotent radial glia/neural stem cells (NSCs) while the SVZ harbors the rapidly proliferative neural precursor cells (NPCs). Evidence from human and animal models indicates that the common history of hydrocephalus and brain maldevelopment starts early in embryonic life with disruption of the VZ and SVZ. We propose that a “cell junction pathology” involving adherent and gap junctions is a final common outcome of a wide range of gene mutations resulting in proteins abnormally expressed by the VZ cells undergoing disruption. Disruption of the VZ during fetal development implies the loss of NSCs whereas VZ disruption during the perinatal period implies the loss of ependyma. The process of disruption occurs in specific regions of the ventricular system and at specific stages of brain development. This explains why only certain brain structures have an abnormal development, which in turn results in a specific neurological impairment of the newborn. Disruption of the VZ of the Sylvian aqueduct (SA) leads to aqueductal stenosis and hydrocephalus, while disruption of the VZ of telencephalon impairs neurogenesis. We are currently investigating whether grafting of NSCs/neurospheres from normal rats into the CSF of hydrocephalic mutants helps to diminish/repair the outcomes of VZ disruption.

Key words: hydrocephalus, abnormal neurogenesis, neural stem cells, stem cell transplantation

INTRODUCTION

It is now understood that hydrocephalus is not only a disorder of CSF dynamics, but also a brain disorder, and that derivative surgery does not resolve most aspects of the disease (Jones and Klinge, 2008). Indeed, 80-90% of the neurological impairment of neonates with fetal onset hydrocephalus is not reversed by derivative surgery. How can we explain the inborn and, so far, irreparable neurological impairment of children born with hydrocephalus? In 2001, Miyano and his co-workers asked a key question: “Humanity lost: the cost of cortical maldevelopment in hydrocephalus. Is there light ahead?” We think that there is some light. There is evidence that the common history of congenital hydrocephalus and brain maldevelopment starts early in the embryonic life with the disruption of the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) zones. However, the nature, mechanisms and extent of the brain impairment linked to hydrocephalus are far from been fully unfolded. We agree with Del Bigio (2001) and Williams et al., (2007) that better treatment of hydrocephalus and the associated neurological impairment will come from a better understanding of the biological basis of the brain abnormalities in hydrocephalus. We think that this view may represent one of the ‘lost

highways’ in hydrocephalus research, as described by Jones and Klinge (2008).

Virtually all cells of the developing mammalian brain are produced in two germinal zones that form the ventricular walls, the VZ and the SVZ (Fig. 1A) (Jacobsen, 1991; Brazel et al., 2003; Gotz and Huttner, 2005; Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Malatesta et al., 2008). The VZ is a pseudostratified neuroepithelium that contains multipotent radial glia/stem cells, hereafter called neural stem cells (NSCs). NSCs line the ventricular lumen and through a long basal process reach the pial surface. A landmark of NSCs is their primary cilia that project to the ventricle and are bathed by the fetal cerebrospinal fluid (CSF, Fig. 1E) (Mori et al., 2005; Kazanis et al., 2008). During a fixed period of brain development, NSCs divide asymmetrically, with one daughter cell remaining as a NSC and the other becoming a neural progenitor cell (NPC). Late in development a population of NSCs differentiates into immature ependyma, which during the first postnatal week mature into ependyma (mouse) (Fig. 1A). In the human, ependymal cell differentiation starts at about the fourth week of gestation and is completed around the 22nd gestational week (Sarnat, 1992). The SVZ is located underneath the VZ along the lateral walls of the lateral ventricles of the embryonic

* Dedicated to Fondecyt for 30 years of support.

Corresponding author: Esteban M. Rodríguez MD, PhD, Instituto de Anatomía, Histología y Patología Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
E-mail: erodrigu@uach.cl. Phone: +56 63 221206 - Fax: +56 63 221604

Received: August 8, 2012. Accepted: September 19, 2012

brain; it contains the neural precursors, which lose contact with the ventricular surface, proliferate extensively and then differentiate into migratory neuroblasts (Fig. 1A) (Brazel et al., 2003; Bonfanti and Peretto, 2007).

Over the years, based on our own and other investigators' evidence, we have progressively come to the view that a *disruption of the VZ and SVZ*, in most cases due to genetic defects, triggers onset of congenital hydrocephalus and abnormal neurogenesis (Fig. 1B). We discuss this evidence in the present review.

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF VENTRICULAR ZONE DISRUPTION

For clarification purposes we shall define the terms used in the present paper to refer to the VZ. At stages of development when the VZ is mostly formed by radial glia/NSCs, the acronym "VZ" will be used. When the VZ is mostly or exclusively formed by multiciliated ependymal cells, the term "ependyma" will be used. The terms "denudation", "disruption" or "loss" will be alternatively used to refer to the disassembling, disorganization, or loss of the VZ cells.

The disruption of the VZ follows a program that has temporal and spatial patterns, progressing as a "tsunami" wave running from the caudal to rostral regions of the developing ventricular system, leaving behind a severe damage. Radial glial/neural stem cells, immature ependyma and mature ependyma all have distinct phenotypes and certainly play quite different roles (Kazanis et al., 2008). What do they have in common so that the denudation wave will hit them all? Junctional proteins appear to be the key to understanding this devastating phenomenon. Up to embryonic day 12 (E12), neuroepithelial cells lining the neural tube are joined together by gap, adherens and tight junctions (Fig. 1A) (Mori et al., 2005; Kazanis et al., 2008). From E12 onward, tight junctions are missing and cell-to-cell adhesion relies on gap and adherens junctions. It is exactly at this time, E12, when disruption of the VZ starts in the mutant *hyh* mouse (Jiménez et al., 2001) (Fig. 1A). What do all the different mutant mouse strains undergoing VZ denudation have in common? Overall, a series of findings indicates that disruption of the VZ arises from a final common pathway involving alterations of vesicle trafficking, abnormal cell junctions and loss of VZ integrity (Ferland et al., 2009).

Cadherins play a key role during neural tube formation (Ivanov et al., 2001) and represent the major calcium-dependent cell junction molecule in the VZ and later in the ependyma (Fig. 1A, 2A-E) (Hatta et al., 1987; Chenn et al., 1998). Antibodies against chicken N-cadherin injected into the fetal CSF disrupt the VZ and lead to denudation of the SVZ and formation of periventricular rosettes (Ganzler-Odenthal et al., 1998). In the *hyh* mouse the mutated gene encodes for α Snap (Chae et al., 2004), a key protein in intracellular trafficking. This mutation results in abnormal transport of N-cadherin to the plasma membrane of NSCs (Chae et al., 2004). As discussed below, these mice undergo a massive disruption of the VZ. Disruption of the VZ occurs in mice in which adherens junction formation has been impaired by removal of regulatory molecules such as Lgl1 (Klezovitch et al., 2004), atypical protein kinase C-lambda (aPKC λ) (Imai et al., 2006), and non-muscle myosin II-B (NMII-b) (Ma et al., 2007). Various other animal models with a defect in cell-cell junctions

undergo VZ disruption, abnormal translocation of cells into the ventricle and hydrocephalus (Kamiguchi et al., 1998; Tullio et al., 2001; Bátiz et al., 2009).

Gap junctions are now regarded not only as channels between neighboring cells, but also as signaling complexes that regulate cell function (Saez et al., 2003; Dbouk et al., 2009). Connexins also form functional hemichannels that provide a pathway linking the intra and extra-cellular milieu (Saez et al., 2005; Dbouk et al., 2009; Orellana et al., 2009). Gap junctions play an important role in cell-cell coupling to maintain synchronized ependymal ciliary beating (Goodenough et al., 1996; Perez Velazquez et al., 2000; Rouach et al., 2002) and CSF flow (Banizs et al., 2005). A series of studies indicates that the formation of gap and adherens junctions are interrelated phenomena (Jongen et al., 1991; Meyer et al., 1992; Fujimoto et al., 1997; Wei et al., 2005; Oka et al., 2006; Laird 2006; Derangeon et al., 2009). This may explain how in the SA of Spina Bifida Aperta (SBA) patients the same VZ cells display abnormalities in both N-cadherin and connexin 43 (Fig. 2E-H) (Sival et al., 2011).

Recently we have demonstrated that the VZ/ependymal cells of human fetuses are joined together by N-cadherin-based adherens junctions and gap junctions (Guerra et al., 2010; Sival et al., 2011). In SBA patients, areas of SA about to become denuded display disorganized VZ/ependyma cells with an abnormal subcellular location of N-cadherin and connexin 43 (Fig. 2D-H). This mirrors what is seen in animal models with a defect in cell-cell junctions. The increased amount of both junction proteins in the cytoplasm of the abnormal VZ cells might reflect abnormalities in their transport to the plasma membrane or, less likely, in their internalization and degradation (see Laird 2006).

In brief, abnormal cell junctions of the VZ cells appear as a final common pathway in the alteration of a series of molecules directly or indirectly involved in the assembly of adherens and gap junctions (Chae et al., 2004; Ferland et al., 2009; Sival et al., 2010; Bátiz et al., 2006; Klezovitch et al., 2004; Imai et al., 2006; Ma et al., 2007; Rasin et al., 2007; Nechiporuk et al., 2007). This may explain how a series of *different* genetic defects affecting the VZ/ependyma finally leads to its disruption, hydrocephalus and abnormal neurogenesis.

A recent finding has shown that non-genetic mechanisms can also lead to VZ disruption (Fig. 1B). Lysophosphatidic acid, a blood-borne factor found in intracranial haemorrhages, binds to receptors expressed by the VZ cells and triggers VZ disruption and hydrocephalus (Yung et al., 2011).

DISRUPTION OF THE VENTRICULAR ZONE OF THE SYLVIAN AQUEDUCT LEADS TO HYDROCEPHALUS

We have extensively studied the mutant mouse *hyh* (hydrocephalus with hop gait) that develops fetal onset hydrocephalus. This mutant displays certain characteristics that make it an appropriate animal model of congenital hydrocephalus. Phenotypical characteristics, such as time of onset, type of abnormal CSF dynamics, clinical evolution, and survival/death rate (Jiménez et al., 2001; Wagner et al., 2003; Bátiz et al., 2005; Páez et al., 2007), are similar to those found in several types of human congenital hydrocephalus.

In the *hyh* mouse, a programmed disruption of the VZ of the ventral wall of the aqueduct (SA) starts early in fetal life (E12.5) (Fig. 1A) and *precedes* the onset of a moderate

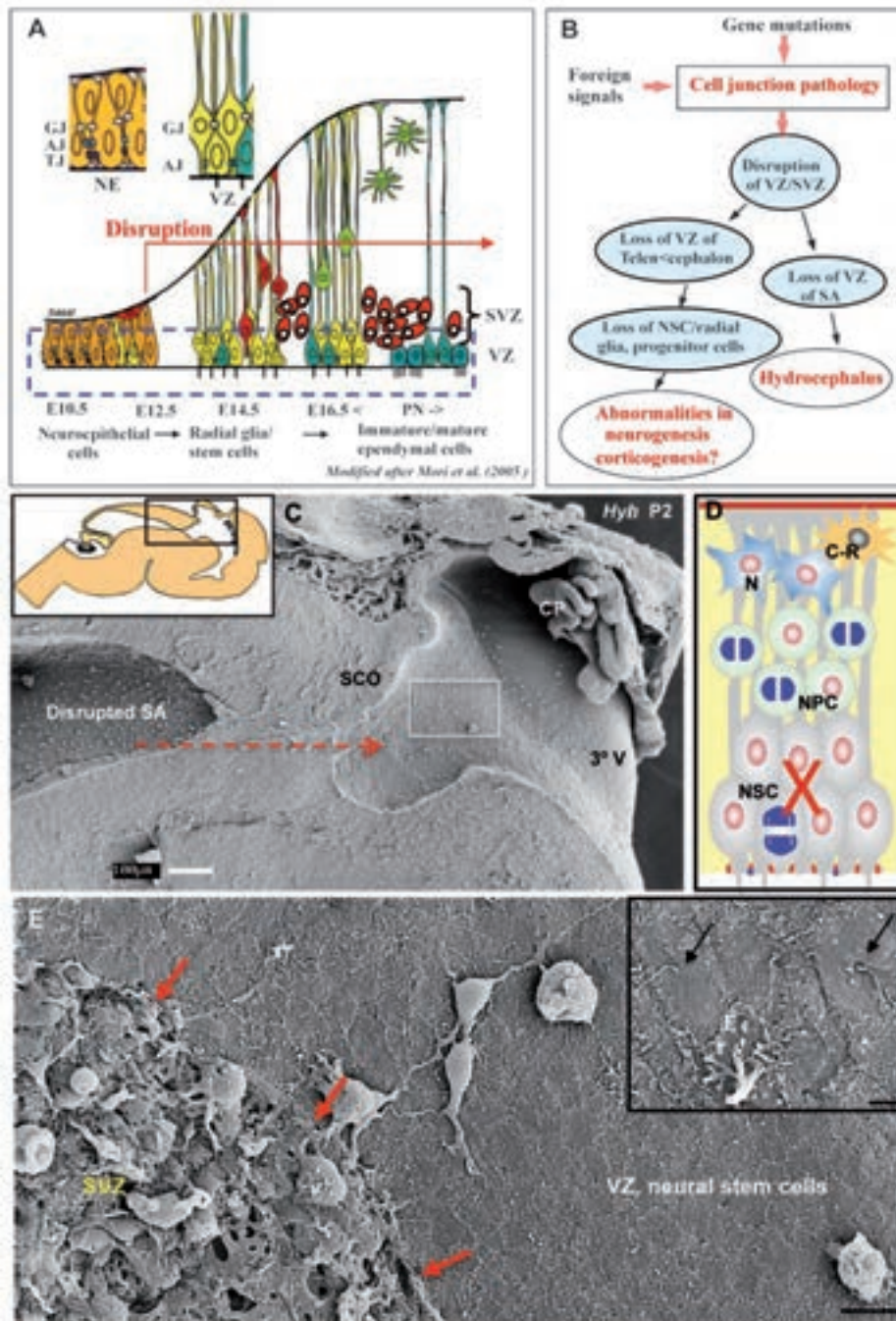


Figure 1. Ventricular zone development and its disruption in hydrocephalic mutant mice. **A**, Drawing depicting development of the mouse neural tube. Up to E12, the tube is lined by neuroepithelial cells (orange) joined together by gap (GJ), adherens (AJ) and tight (TJ) junctions. After E12, neuroepithelial cells start to differentiate into radial glial/stem cells (yellow). These cells form the ventricular zone (VZ), lining the lumen of the neural tube. At about E14, the stem cells begin to divide asymmetrically, with one of the daughter cells becoming neural precursor cells (red) that form the subventricular zone (SVZ). Late in embryonic life and early in postnatal life, radial glia/stem cells differentiate into ependymal cells that line the ventricular walls of the adult brain. In the mutant mouse *hyh*, disruption of the ventricular zone starts at E12. **B**, Flow chart representing the hypothesis that cell junction pathology of the VZ cells leads to both hydrocephalus and abnormal neurogenesis. **C**, Scanning electron microscopy of a newborn *hyh* hydrocephalic mutant mouse. Disruption of ventricular zone along the Sylvian aqueduct and ventricle progresses as a wave expanding caudal-rostrally (broken red arrow). The rectangle frames the disruption front shown in **E**. **Inset**: Drawing of the *hyh* mouse brain. The area framed is similar to that shown in **C**. CP, choroid plexus; 3° V, third ventricle; SCO, subcommissural organ. **D**, Drawing of the cells forming the ventricular zone (NSC, neural stem cells) and the subventricular zones (NPC, neural precursor cells) of the developing mouse brain. N, Neuron; C-R, Cajal Retzius cell. Disruption of the VZ (large red X) implies the loss of NSC. **E**, Detailed view of area framed in figure **C**. Red arrows point to the disruption front, leaving behind the denuded subventricular zone (SVZ). **Inset**: High magnification of two stem cells (arrows) displaying a primary cilium and one multiciliated ependymal cell (**E**). Bars: **C**, 100 μ m; **E**, 6 μ m; inset in **E**, 1 μ m.

Figs. C and E: from Wagner et al. 2003

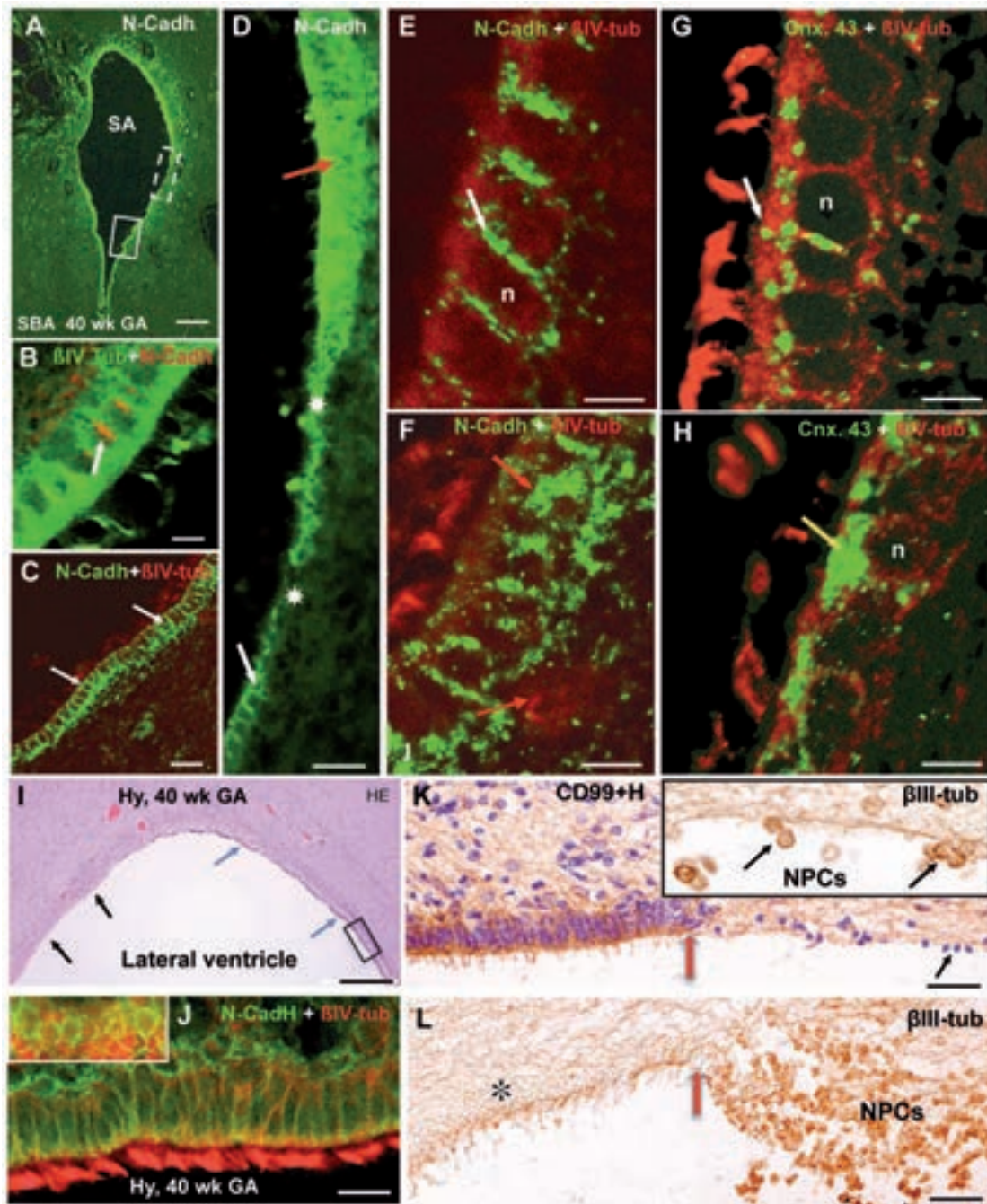


Figure 2. The ventricular zone of the Sylvian aqueduct and telencephalon of human hydrocephalic fetuses undergo disruption.

A-H, Cross section of the Sylvian aqueduct of a fetus with spina bifida aperta (SBA), 40 week gestational age. **A**, Immunofluorescence for N-cadherin. In the wall of the SA, regions with a normal appearance (solid line rectangle) coexist with others undergoing disruption (broken line rectangle). **B**, **C**, Detailed magnification of area shown in solid line rectangle of Fig. A. Normal expression of N-cadherin in ependymal cells not yet affected. The protein is mostly located at the lateral plasma membrane, forming adherens junctions (arrows). **D**, Micrograph of area similar to that framed by the broken line rectangle in Figure A. There are areas with normal location of N-cadherin (full white arrow), others with little or no N-cadherin (asterisk) and still with cells loaded with this protein (red arrow). **E**, **F**, Confocal microscopy of ependyma with normal (E, white arrow) and abnormal (F, red arrow) expression of N-cadherin. n, cell nucleus. **G**, **H**, Confocal microscopy of ependyma with normal (G, white arrow) and abnormal (H, orange arrow) expression of connexin 43. n, cell nucleus. **I-L**, Telencephalon of a hydrocephalic human fetus, 40 weeks gestational age. **I**, In the lateral ventricle there are large areas devoid of ependyma (black arrows) and others lined by ependyma (blue arrows). **J**, Area of normal ependyma similar to that framed in Fig. I, double immunostained for N-cadherin (green) and β IV-tubulin (red). N-cadherin is arranged in the lateral plasma membrane as a complete belt (see insert). **K**, Border region between normal and denuded ependyma (red arrow). Immunostaining with anti-CD99. In the denuded area, β III-tubulin+ neural precursors (NPCs) (see insert) reach the ventricular lumen. **L**, A large mass of β III-tubulin+ neural precursor cells (NPCs) are translocated to the ventricle. Arrow, border between intact (asterisk) and disrupted ependyma. Bars: A, 350 μ m; B, 9 μ m; C, 36 μ m; D, 21 μ m; E-F, 7 μ m; G, 8 μ m; H, 5 μ m; I, 250 μ m; J, 11 μ m; K-L, 25 μ m.

Figs. A-H: from Sival et al. 2011. Figs. I, K, L: from Domínguez-Pinos et al. 2005.

communicating hydrocephalus. The loss of the ependyma of the dorsal wall of the SA occurring shortly after birth leads to fusion of the denuded ventral and dorsal walls of SA, resulting in aqueductal obliteration (Fig. 3E) and severe hydrocephalus (Fig. 3F) (Jiménez et al., 2001; Wagner et al., 2003; Páez et al., 2007). The phenomenon of VZ denudation associated with the onset of hydrocephalus has also been found in several mutant mice (Klezovitch et al., 2004; Imai et al., 2006; Ma et al., 2007; Rasin et al., 2007; Nechiporuk et al., 2007). Moreover, in human hydrocephalic fetuses, VZ/ependymal denudation precedes, and probably triggers the onset of hydrocephalus (Domínguez-Pinos et al., 2005; Sival et al., 2011). It can be postulated, on solid grounds, that a primary alteration of the VZ due to various genetic defects triggers the onset of congenital hydrocephalus (Fig. 3). The loss of the VZ may trigger hydrocephalus through two different mechanisms. First, the abnormal expression of connexin 43 and the loss of the ependyma in the SA imply the abnormal function or the absence of multiciliated cells; consequently the flow of CSF through the aqueduct would be curtailed. Later, the complete loss of ependyma (perinatal period) leads to fusion of the denuded neuropiles and stenosis/obliteration of the SA. Collectively, these alterations cause severe hydrocephalus (Fig. 3A, E, F).

DISRUPTION OF THE VENTRICULAR ZONE OF THE TELENCEPHALON LEADS TO ABNORMAL NEUROGENESIS

In *hyh* mutant mice, the disruption of the VZ follows a program that has temporal and spatial patterns. The program is turned on at E12 (Fig. 1A) and turned off by the end of the second postnatal week. After the third postnatal week, and throughout the life span, the denuded areas remain devoid of ependyma (Fig. 3F). Spatially, the loss of the VZ progresses as a "tsunami" wave running from caudal to rostral regions of the developing ventricular system, leaving behind a severe damage (Fig. 1C, E, 3D) (Jiménez et al., 2001; Wagner et al., 2003; Páez et al., 2007). Disruption of the VZ after birth implies the loss of ependyma; however, the disruption of the VZ during fetal life results in the loss of NSCs (Fig. 1D, E) and a disorganization of the SVZ, indicating that abnormal neurogenesis and hydrocephalus are linked at the etiological level (Fig. 1B, 3A).

In the pathophysiologic program of VZ disruption, the loss of VZ/ependyma occurs in *specific regions* of the SA and ventricular walls, and at *specific stages* of brain development. This explains why only certain brain structures have an abnormal development, which in turn results in a specific neurological impairment (Jimenez et al., 2001; Wagner et al., 2003; Páez et al., 2007).

HOW AND TO WHAT EXTENT ARE THE PROLIFERATION, MIGRATION AND DIFFERENTIATION OF NEURAL PROGENITOR CELLS OF THE SVZ AFFECTED BY THE LOSS OF THE ADJACENT VZ?

Abnormal proliferation of neural progenitors. NPCs divide to generate either two proliferative daughter cells or one or two postmitotic neuronal daughter cells; the former predominates early, with neuron-generating divisions predominating later. In the SVZ of *hyh* mice, devoid of a VZ, there is an early overproduction of neurons at the expense of progenitor cells; this would explain the progressive loss of progenitor cells

in *hyh* mutants from E12.5 on (Takahashi et al., 1994, 1995; Caviness and Takahashi, 1995; Caviness et al., 1995; Chae et al., 2004). The loss of the radial glia/neural stem cells forming the VZ is also expected to contribute to a reduced number of SVZ progenitors. There is apparently no information on the proliferative activity of SVZ neural precursors of human fetuses with disruption of the VZ.

Abnormal migration of neuroblasts. In human hydrocephalic fetuses, an abnormal expression of N-cadherin, as seen in SA, has also been found in the VZ/ependyma of the telencephalon (Guerra et al., 2010). Many of these cases displayed extensive areas of the lateral ventricles with a disruption of the VZ/ependyma and displacement of NPCs into the ventricle (Fig. 2I-L) (Domínguez-Pinos et al., 2005; de Wit et al., 2008; Guerra et al., 2010).

Impairment of neuronal migration gives rise to several genetic malformations of the developing cortex: lissencephaly (smooth brain), subcortical band heterotopia (heterotopic neurons arrested under the normal cerebral cortex) and periventricular heterotopia (PH) (Barkovich et al., 1991; Ricci et al., 1992; Kamuro and Tenokuchi 1993; Dobyns et al., 1996; Ferland et al., 2009). PHs are clusters of neuroblast/neurons ectopically positioned along the lateral ventricles (Fig. 3C) (Ferland et al., 2009). Humans with disruption in the VZ of the telencephalon carry PH primarily composed of later-born neurons (Ferland et al., 2009). Mutations in either of two human genes, filamin A (FLNA) or ADPribosylation factor guanine exchange factor 2 (ARFGEF2), cause PH (Sheen et al., 2001, 2003). In the mouse, the loss of FlnA function affects cell adhesion, disrupts the VZ and impairs neuronal migration. In the *hyh* mouse (carrying a mutation in α Snap), the progressive denudation of the VZ also leads to PH formation (Chae et al., 2004; Ferland et al., 2009). These findings have led to the proposal that PH formation arises from a disruption in the VZ resulting from alterations of vesicle trafficking and cell-cell adhesion (Ferland et al., 2009). Furthermore, disruption of the VZ implies the loss of radial glia. Therefore, neuronal migration would be expected to be impaired at the sites of VZ disruption, leading to the formation of PH (Fig. 3C) (de Wit et al., 2008; Ferland et al., 2009). Nevertheless, little is known about how much the disruption of the VZ in human fetuses affects corticogenesis. This key issue is under current investigation in our laboratories.

Abnormal neuron differentiation. In the *hyh* mutant, the brain cortex is markedly smaller as compared with wild-type embryos (Chae et al., 2004; Páez et al., 2007) and it has excessive early-born neurons (thicker layer VI) and few late-born neurons (thinner layers II-IV). However, alteration of the cortex is not a widespread phenomenon. The loss of the VZ in specific regions of the ventricular walls and at specific stages of brain development explains why only certain brain structures have an abnormal development. Thus, in *hyh* mice and other animal models, the brain cortex is not affected homogeneously, with the cingular and frontal cortices being the most altered regions (Jones et al., 1987, 1991; Bruni et al., 1988; Páez et al., 2007).

How does disruption of the VZ affect the two main populations of cortical neurons, gabaergic and glutamatergic, considering that they arise from VZ located at different anatomical sites? In the mouse, most gabaergic neurons

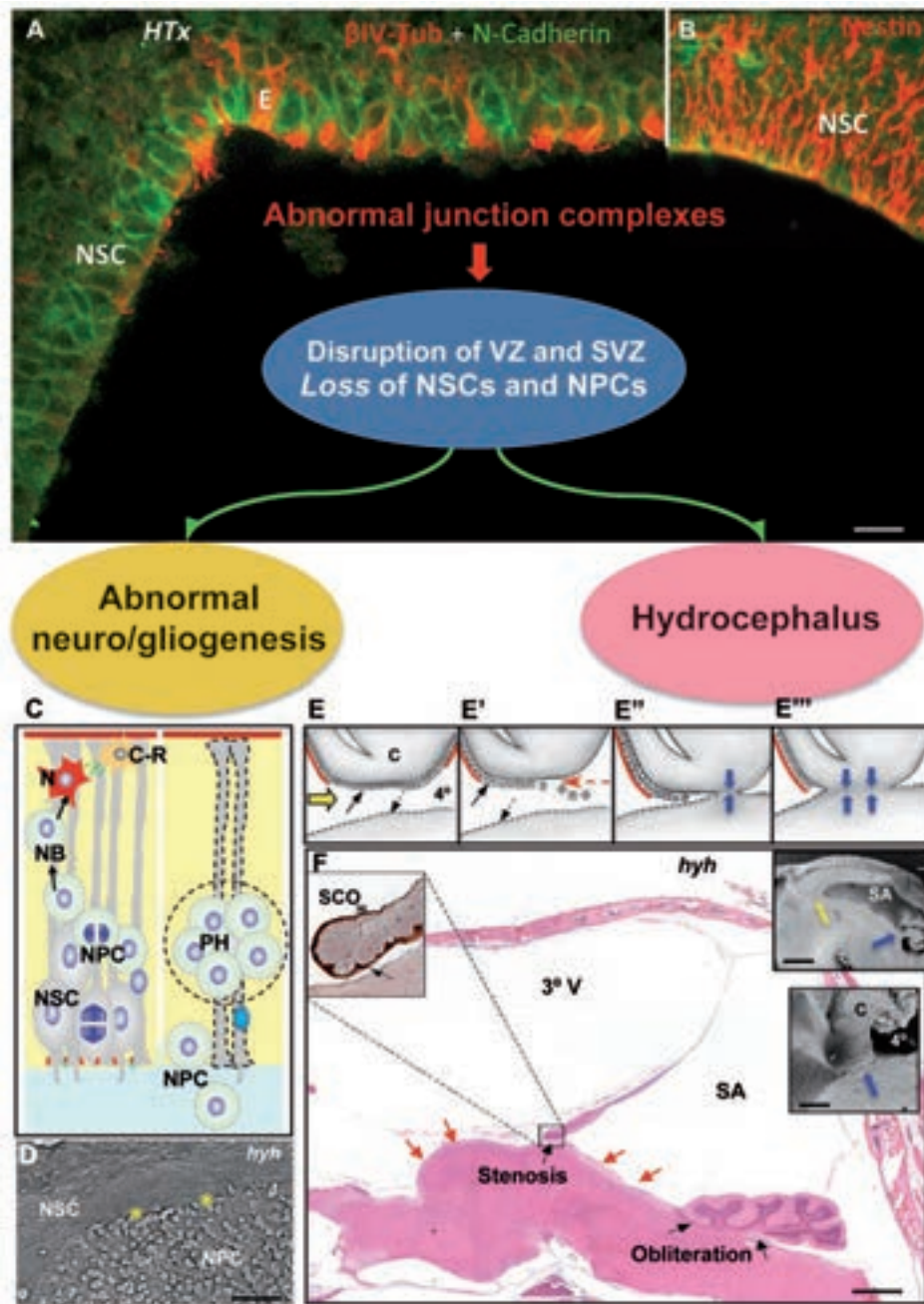


Figure 3. Abnormal junction complexes of cells forming the ventricular zone may lead to disruption of the ventricular and subventricular zones, hydrocephalus and abnormal neurogenesis. **A**, The lateral ventricle of PN1 HTx rats is lined by numerous neural stem cells (NSC, green) and a few ependymal cells (E, red), both cell types expressing N-cadherin. **B**, Area similar to that in Fig. A. Immunostaining for nestin shows that most cells of the ventricular zone are neural stem cells (NSC). **C**, Line drawing depicting the normal neurogenic process, from neural stem cells (NSC) to neural precursor cells (NPC), to migratory neuroblasts (NB) and finally to neurons (N). The loss of NSCs (right side of drawing) would lead to arrested migration of neuroblasts, thereby forming paraventricular heterotopias (PH) and translocation of NPCs into the ventricle. C-R, Cajal Retzius cell. **D**, In the *hyh* mouse, disruption of the ventricular zone (NSC, asterisks) exposes the NPCs of the subventricular zone to the ventricular cerebrospinal fluid. **E-E'''**, In *hyh* mice, disruption of the VZ lining the ventral wall of the aqueduct occurs during early fetal life (E, broken line). Disruption of the dorsal wall of aqueduct occurs shortly after birth (E', red arrow). Then the ventral and dorsal denuded walls fuse, leading to aqueduct obliteration (E'', E''', blue arrows) and hydrocephalus. **F**, Sagittal section of the brain of a *hyh* mouse with severe hydrocephalus. A marked stenosis of the rostral end of the aqueduct at the site of the subcommissural organ interferes with CSF circulation between the third ventricle (3° V) and the Sylvian aqueduct (SA) and the obliteration of the caudal end of the SA blocks CSF circulation towards the fourth ventricle. Red arrows, denuded ventral walls. **Top left inset**, Detail of the stenosed region of SA. SCO, subcommissural organ. **Right top inset**, Scanning electron microscopy of a PN2 hydrocephalic *hyh* mouse, showing the zones of stenosis (yellow arrow), obliteration (blue arrow) and the expansion of the SA. **Right bottom inset**, Detail of obliterated region of SA (Blue arrow), C, cerebellum; 3°, fourth ventricle. Bars: A, 25 μ m; D, 20 μ m; F, 250 μ m; right top inset, 400 μ m; right bottom inset, 100 μ m.

Fig. E: from Wagner et al. 2003. F: from Batiz et al. 2006.

originate from the ganglionic eminences (Anderson et al., 1997, 2002; Corbin et al., 2001; Marín and Rubenstein, 2001, 2003; Wichterle et al., 2001; Nadarajah and Parnavelas, 2002). In hyh mice, the disruption of the VZ of the ganglionic eminences occurs from E14 on (Jiménez et al., 2001; Ferland et al., 2009), thus severely impairing neurogenesis of gabaergic neurons (Vío et al., 2010). By contrast, disruption of the VZ of the pallium occurs during the late period of development. Here, late glutamatergic neurons and gliogenesis would be expected to be impaired.

There is virtually no information on brain cortex alterations of human cases with disruption of the telencephalic VZ. One study reported a widespread loss and disorganization of the VZ in the brain of children with lissencephaly and other disorders of neuroblast migration (Sarnat et al., 1993).

AT SITES OF VZ DISRUPTION, NEURAL PROGENITORS OF THE SVZ ARE ABNORMALLY DISPLACED INTO THE VENTRICLE. WHAT IS THEIR FATE?

All mutant mice carrying a disruption of the VZ show neural progenitors reaching the ventricle. A puzzling question is the fate of neural progenitors reaching the ventricle. Do they undergo cell death? Do they get free in the CSF and move to distant locations? Do they continue proliferating in the CSF? The presence of apparently healthy NPCs on the denuded ventricular surface of hydrocephalic human fetuses (Fig. 2K, L) (Domínguez-Pinos et al., 2005) and their collection from the CSF of hydrocephalic fetuses (Krueger et al., 2006) support the possibility that in these human and animal mutant fetuses undergoing VZ disruption, those NPCs migrating through the denuded ventricular surface finally get free in CSF. The interesting question of the fate of the NSCs and NPCs reaching the CSF is fully open. Ongoing experiments in our laboratory indicate that these cells can be collected from the CSF and, under specific culture conditions, develop into neurospheres.

ALTERATIONS OF THE MICROENVIRONMENT OF THE NEUROGENIC NICHE AFTER DISRUPTION OF THE VZ

The microenvironment of the VZ and SVZ regulates the behavior of neuronal progenitors through diffusible signals (Kazanis et al., 2008). Many such signals have been found in fetal CSF (fCSF), indicating that fCSF is part of the neurogenic niche (Owen-Lynch et al., 2003; Gato et al., 2005; Miyan et al., 2006; Johanson et al., 2008, 2011; Gato and Desmond, 2009). Two proteomic analyses of fetal CSF of rats and humans have revealed numerous compounds that likely are cues for different phases of neurogenesis (Parada et al., 2005; Zappaterra et al., 2007). Although the origin of most of these fCSF compounds is unknown, some are secreted by specialized regions of the VZ such as the choroid plexus (Zappaterra et al., 2007; Johanson et al., 2008) and subcommissural organ (Rodríguez et al., 1998; Montecinos et al., 2005, Vío et al., 2007). Considering fCSF as part of the microenvironment of the VZ and SVZ, an abnormal hydrocephalic fCSF would be expected to affect the VZ and SVZ. Indeed, *in vivo* and *in vitro* studies of HTx rats that develop inherited hydrocephalus revealed that changes in fCSF composition may lead to abnormal corticogenesis (Mashayekhi et al., 2002).

IS THERE AN OPPORTUNITY FOR DIMINISHING/REPAIRING THE DISRUPTION OF THE VZ AND SVZ AND ITS CONSEQUENCES: ONSET OF HYDROCEPHALUS AND ABNORMAL NEUROGENESIS?

A distinction must be made between (i) brain *maldevelopment* due a primary pathology of the VZ that precedes or accompanies the onset of hydrocephalus, and (ii) neurological impairment due to brain *damage* caused by hydrocephalus. The former occurs during development and consequently hydrocephalic neonates are born with a neurological deficit. Brain *damage* is a postnatal acquired defect essentially caused by ventricular hypertension and abnormal CSF.

Brain damage is associated with regional ischemia, disruption of white matter pathways and alteration of the microenvironment of neural cells (Del Biggio, 2001, 2010). Derivative surgery, the almost exclusive treatment of hydrocephalus today, is aimed to prevent or diminish brain *damage*. It is clear that hydrocephalic patients improve clinically after shunting or ventriculostomy. The improvement is due to reduced intracranial pressure, which likely increases white matter blood flow (Del Biggio, 2001), and probably to resumption of the clearance role of CSF. However, derivative surgery does not reverse the inborn brain defects. This has led a study group on hydrocephalus to conclude that "Fifty years after the introduction of shunts for the treatment of this previously untreatable disorder, we must acknowledge that the shunt is not a cure for hydrocephalus; it is only a patch" (Bergsneider et al., 2006). One of the conclusions of the National Institutes of Health-sponsored workshop on "Priorities for hydrocephalus research" held in 2007 was: "The most forward-looking research priorities are for future treatments. These include not only the development of novel medical devices or surgical techniques, which represent a continuation of the first 50 years of hydrocephalus therapeutic research, but also the development of novel therapies that should emerge from improved understanding of the basic biology of hydrocephalus and its impact on the brain... There is a need to determine the potential role of stem cell therapy, for example, to supply trophic agents" (Williams et al., 2007).

Based on the evidence that the common history of fetal onset hydrocephalus and abnormal neurogenesis begins with disruption of the VZ and SVZ, we have begun to explore strategies for diminishing/repairing such disruptions.

Grafting of stem cells or neurospheres into the CSF. There is growing evidence that NSC transplantation represents a great opportunity for the treatment of many neurological diseases (Sievertzon et al., 2005; Buddensiek et al., 2010; Gage, 2000; Armstrong and Svendsen, 2000; Weissman, 2000; Neuhuber et al., 2008). Stem cells used for transplantation into the CNS include mesenchymal stem cells (hMSCs) (Satake et al., 2004), NSCs (Bai et al., 2003; Buddensiek et al., 2010) and NPCs (Kim et al., 2004; Ohta et al., 2004; Wu et al., 2002). NSCs can be obtained from fetal brain (Gage, 2000) and from regions of the adult brain such as the hippocampal subgranular zone/dentate gyrus and the subventricular zone (Rietze et al., 2001). Under certain culture medium conditions, NSCs grow to form "neurospheres" (Park et al., 2008). Neurospheres are able to generate neurons, astroglia and oligodendroglia (Fig. 4A-J).

Worth noticing is that fetal and adult CSF is an important component of the microenvironment of NSCs and NPCs during

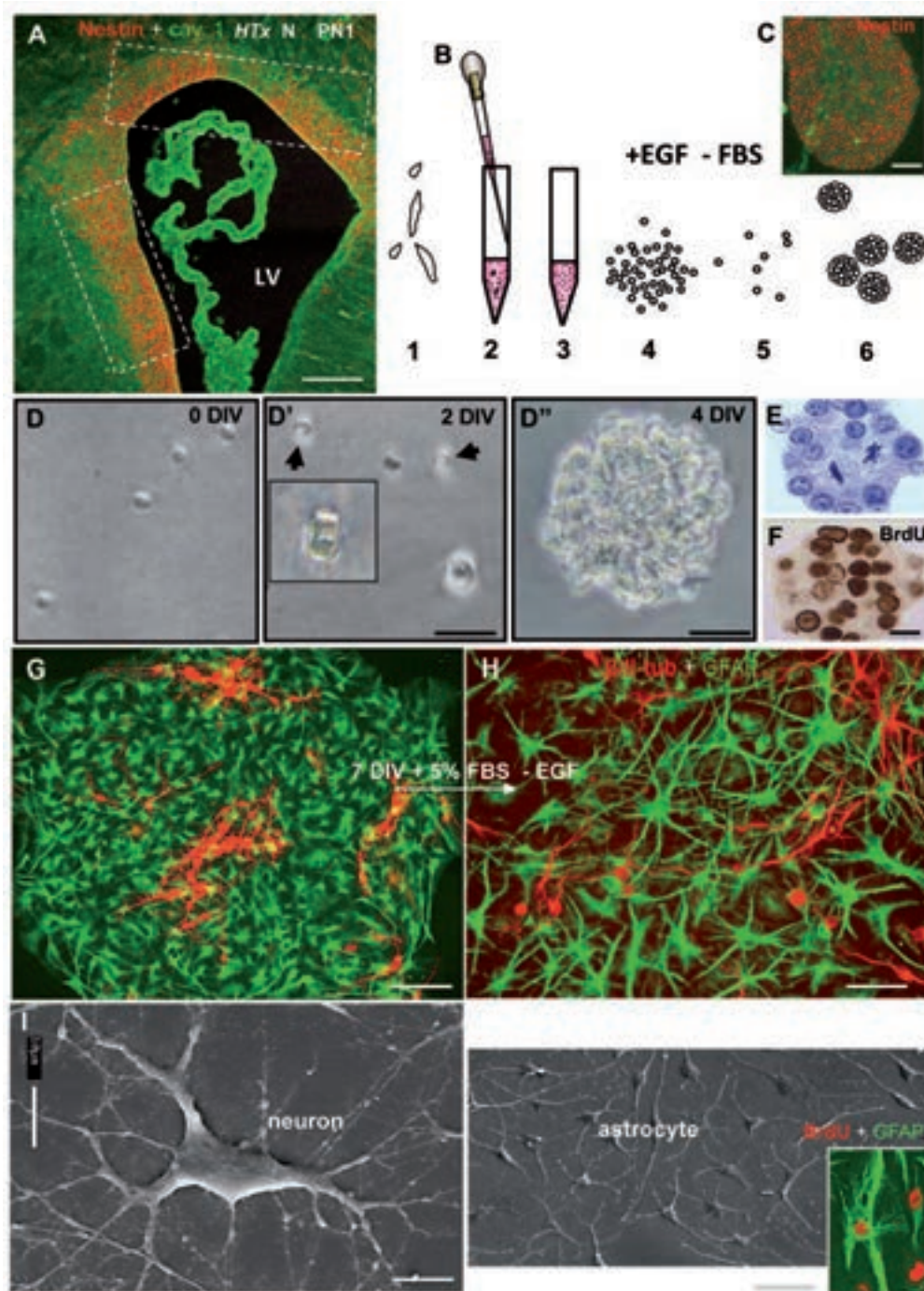


Figure 4. A single neural stem cell forms a neurosphere that after a few days *in vitro* can differentiate into neurons and glia.

A, Brain of a HTx rat, at PN1, processed for double immunofluorescence to reveal nestin (red) and caveolin 1 (green). At this age, the dorsal and lateral walls of the lateral ventricles (LV) are lined by neural stem cells (red). These areas can be dissected out and used for NSC cloning. **B**, The neurosphere assay is a classical neural stem cell culture technique. After an initial dissection of the lateral ventricular wall (step 1), the tissue is transferred to a plastic falcon tube and mechanically disaggregated to obtain a single cell suspension (steps 2, 3). The cells are then cultured in serum-free media in the presence of EGF as a mitogen (step 4). In the course of the first two days *in vitro* (DIV), the vast majority of differentiated cells die (step 5). The surviving ones undergo cell division and form spherical clones called "neurospheres" (3-4 DIV, step 6). **D**, **D'**, **D''**, Phase-contrast micrographs of NSC developing into neurospheres after 4 DIV. **Inset**: dividing NSC. **E**, A neurosphere fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with toluidine blue. Cells undergoing mitosis are seen. **F**, A neurosphere cultured in the presence of BrdU, showing that all its cells are proliferative. **G**, A neurosphere cultured in a medium containing 5% fetal bovine serum (FBS) and devoid of EGF starts to differentiate into neurons (β III-tubulin, red) and astrocytes (GFAP, green). **H**, After a few days *in vitro* in this medium most cells have differentiated into neurons (red) and astrocytes (green). **I**, **J**, Cells similar to those seen in Fig. H, but viewed under scanning electron microscopy. **Inset**: Double immunofluorescence for BrdU and GFAP to show that the differentiated astrocytes originate from the proliferative cells of neurospheres. Bars: D, D', 55 μ m; D'', 20 μ m; E-F, 10 μ m; G, 100 μ m; H, 40 μ m; I-J, 10 μ m;

pre- and post-natal neurogenesis (Johanson et al., 2008, 2011). Therefore, CSF is expected to be a beneficial medium for NSC survival. Indeed, NSCs cultured in a medium containing CSF show increased survival and proliferation as compared to standard culture media (Gato et al., 2005). Adult human leptomeningeal (intrathecal) CSF is also an appropriate environment for the *in vitro* survival and differentiation of adult human NSCs (Buddensiek et al., 2010). Successful NSCs transplantation into the ventricular or subarachnoidal CSF also supports the view that CSF is a beneficial environment for NSCs to survive, growth and migrate (see below).

Current investigations in our laboratories indicate that neurospheres developed from NSCs collected from the SVZ of normal rats (see Fig. 4), when cultured in the presence of CSF from normal or hydrocephalic HTx rats, differentiate into neurons and glia. It seems likely that NSCs obtained from normal HTx rats, when grafted into a lateral ventricle of hydrocephalic HTx rats, would generate normal neuronal and glial lineages. We have just started exploring this possibility using neurospheres transfected with green fluorescence protein. Our goal is to promote incorporation of the grafted NSCs into the disrupted VZ and SVZ, in order to improve brain functions compromised by hydrocephalus

Delivery of NSCs, NPC or MSCs into CSF. CSF transplantation or explantation of stem/progenitor cells is emerging as an alternative to intraparenchymal grafts of therapeutic cells near injured neural tissue. The multifocal nature of multiple sclerosis makes intraparenchymal cellular therapy difficult. However, a hopeful strategy is to use the CSF administration pathway, which has widespread flow capabilities. Mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) were grafted with neurospheres placed into ventricular CSF; the NPCs entered into demyelinating areas, differentiated into mature brain cells and promoted multifocal remyelination and functional recovery (Pluchino et al., 2003). In mice with induced stroke, NPCs have been administered into the parenchyma near the infarcts and into a lateral ventricle; CSF administration was more efficient in distributing NPCs to the lesion area (Kim et al., 2004). Hippocampus-derived neurosphere cells, isolated from a transgenic rat expressing green fluorescent protein, were transplanted into the fourth ventricle or cisterna magna of rats with spinal cord injury. The injected cells followed the flow of subarachnoidal CSF and survived as clusters on the pial surface of the spinal cord. Notably, a large number of them migrated into the lesion site, integrated into the injured spinal cord and survived within the host spinal cord for as long as 8 months without any tumorigenic changes (Wu et al., 2002, 2004; Bai et al., 2003). NSCs transplanted into the 4th ventricle of animals with injured dorsal roots reached the lesion root and associated with axons in the same manner as Schwann cells (Ohta et al., 2004). These two experiments indicate that grafted NSCs differentiate in a site-dependent manner (see also Rosser et al., 2000). Another approach has been the delivery of NSCs by lumbar puncture to rats with spine injury; cells travelled through the CSF to the site of injury in the spinal cord, differentiated into nestin-positive, immature neurons or glial cells (Satake et al., 2004) and supported neuroprotection and partial recovery of function (Neuhuber et al., 2008).

Immune cells and immune molecules have been shown to support neurogenesis from NSCs and NPCs in the adult brain

(González-Pérez et al., 2010; Molina-Holgado and Molina-Holgado, 2010). On the other hand, NPCs transplanted into mice after spinal cord injury contributed to functional recovery mostly by inducing microglia/macrophages to express their repairing phenotype secreting factors such as BDNF and noggin (Ziv et al., 2006; Ziv and Schwartz 2008). The onset of disruption of the VZ is associated with the arrival of microglia/macrophages. Thus, the possibility of a fascinating cross talk between NSCs undergoing disruption and immune cells is being explored, since it could become a therapeutic target.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the valuable technical support of Mr. Genaro Alvial. This work was supported by Grants from Fondecyt (Chile) 1070241 and 1111018 to EMR; Hydrocephalus Association Established Investigator Award to Drs. Rodríguez, McAllister and Johanson N° 51002705; Grants PS09/0376 from Instituto de Salud Carlos III (Spain) and PCI2006-A/-0669 from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) to AJJ; Universidad Austral de Chile/DID S-2006-72 to KV.

REFERENCES

- ANDERSON SA, EISENSTAT DD, SHI L, RUBENSTEIN JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-6.
- ANDERSON SA, KAZNOWSKI CE, HORN C, RUBENSTEIN JL, MCCONNELL SK (2002) Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons *in vivo*. *Cereb Cortex* 12:702-9.
- ARMSTRONG RJ, SVENDSEN CN (2000) Neural stem cells: from cell biology to cell replacement. *Cell Transplant* 9:139-52.
- BAI H, SUZUKI Y, NODA T, ET AL (2003) Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat: a method for cell transplantation. *J Neurosci Methods* 124:181-7.
- BANIZS B, PIKE MM, MILLICAN CL, FERGUSON WB, KOMLOSI P, SHEETZ J, BELL PD, SCHWIEBERT EM, YODER BK (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132:5329-5339.
- BARKOVICH AJ, KOCH TK, CARROL CL (1991) The spectrum of lissencephaly: report of ten patients analyzed by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 30:139-46.
- BÁTIZ LF, PÁEZ P, JIMÉNEZ AJ, RODRÍGUEZ S, WAGNER C, PÉREZ-FIGARES JM, RODRÍGUEZ EM (2006) Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the *hyh* mice carrying a point mutation in *alpha-SNAP*. *Neurobiol Dis* 23:152-68.
- BÁTIZ LF, DE BLAS GA, MICHAUT MA, RAMÍREZ AR, RODRÍGUEZ F, RATTO MH, OLIVER C, TOMES CN, RODRÍGUEZ EM, MAYORGA LS (2009) Sperm from *hyh* mice carrying a point mutation in *alphaSNAP* have a defect in acrosome reaction. *PLoS ONE* 4:e4963.
- BERGSNEIDER M, EGNOR MR, JOHNSTON M, KRANZ D, MADSEN JR, MCALLISTER JP 2ND, STEWART C, WALKER ML, WILLIAMS MA (2006) What we don't (but should) know about hydrocephalus. *J Neurosurg* 104:157-9.
- BONFANTI L, PERETTO P (2007) Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol* 83:24-36.
- BRAZEL CY, ROMANKO MJ, ROTHSTEIN RP, LEVISON SW (2003) Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol* 69:49-69.
- BRUNI JE, DEL BIGIO MR, CARDOSO ER, PERSAUD TV (1988) Neuropathology of congenital hydrocephalus in the SUMS/NP mouse. *Acta Neurochir (Wien)* 92:118-22.
- BUDDENSIEK J, DRESSSEL A, KOWALSKI M, RUNGE U, SCHROEDER H, HERMANN A, KIRSCH M, STORCH A, SABOLEK M (2010) Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC Neurosci* 11:48.

- CAVINESS VS, JR., TAKAHASHI T (1995) Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17:159-63
- CAVINESS VS, JR., TAKAHASHI T, NOWAKOWSKI RS (1995) Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci* 18:379-83.
- CHAE TH, KIM S, MARZ KE, HANSON PI, WALSH CA (2004) The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36:264-270.
- CHENN A, ZHANG YA, CHANG BT, MCCONNELL SK (1998) Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol Cell Neurosci* 11:183-193.
- CORBIN JG, NERY S, FISHELL G (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1177-82.
- DBOUK HA, MROUE RM, EL-SABBAN ME, TALHOUK RS (2009) Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal* 7:4.
- DERANGEON M, BOZON V, DEFAMIE N, PEINEAU N, BOURMEYSTER N, SARROUILHE D, ARGIBAY JA, HERVE JC (2009) 5-HT₂ receptors antagonistically influence gap junctional coupling between rat auricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48:220-229.
- DE WIT OA, DEN DUNNEN WFA, SOLLIE KM, MUÑOZ RI, MEINERS LCO, BROUWER F, RODRÍGUEZ EM, SIVAL DA (2008) Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningocele. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:4.
- DEL BIGIO MR (2001) Pathophysiological consequences of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am* 12:639-49.
- DEL BIGIO MR (2010) Neuro pathology and structural changes in hydrocephalus. *Dev Disabil Res Rev* 16:16-22.
- DOBYNS WB, ANDERMANN E, ANDERMANN F, ET AL (1996) X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology* 47:331-9.
- DOMÍNGUEZ-PINOS MD, PÁEZ P, JIMÉNEZ A, WEIL B, ARRAEZ MA, PÉREZ-FIGARES JM, RODRÍGUEZ EM (2005) Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:595-604.
- FERLAND RJ, BÁTIZ LF, NEAL J, LIAN G, BUNDOCK E, LU J, HSIAO Y, DIAMOND R, MEI D, BANHAM A, BROWN P, VANDERBURG C, JOSEPH J, HECHT J, FOLKERTH R, GUERRINI R, WALSH C, RODRÍGUEZ EM, SHEEN V (2009) Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum Mol Genet* 18:497-516.
- FUJIMOTO K, NAGAFUCHI A, TSUKITA S, KURAOKA A, OHOKUMA A, SHIBATA Y (1997) Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110(Pt 3):311-322.
- GAGE FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-8.
- GANZLER-ODENTHAL SI, REDIES C (1998) Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci* 18:5415-5425.
- GATO A, MORO JA, ALONSO MI, BUENO D, DE LA MANO A, MARTIN C (2005) Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 284:475-84.
- GATO A, DESMOND ME (2009) Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol* 327:263-72.
- GONZÁLEZ-PÉREZ O, QUIÑONES-HINOJOSA A, GARCÍA-VERDUGO JM (2010) Immunological control of adult neural stem cells. *J Stem Cells* 5(1):23-31.
- GOODENOUGH DA, GOLIGER JA, PAUL DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502
- GOTZ M, HUTTNER WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-88
- GUERRA M, SIVAL D, JIMÉNEZ A, DOMÍNGUEZ-PINOS D, DEN DUNNEN W, BATIZ F, PÉREZ-FIGARES JM, RODRÍGUEZ EM (2010) Defects in cell-cell junctions lead to neuroepithelial/ependymal denudation in the telencephalon of human hydrocephalic foetuses. *Cerebrospinal Fluid Research* 2010, 7(Suppl 1):S56.
- HATA K, TAKAGI S, FUJISAWA H, TAKEICHI M (1987) Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120:215-227.
- IMAI F, HIRAI S, AKIMOTO K, KOYAMA H, MIYATA T, OGAWA M, NOGUCHI S, SASAOKA T, NODA T, SHIGEO O (2006) Inactivation of aPKC λ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 133:1735-44.
- IVANOV DB, PHILIPPOVA MP, TKACHUK VA (2001) Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)* 66:1174-1186.
- JACOBSEN M (1991) *Developmental neurobiology*. New York: Plenum.
- JIMÉNEZ AJ, TOMÉ M, PÁEZ P, WAGNER C, RODRÍGUEZ S, FERNÁNDEZ-LLEBRES P, RODRÍGUEZ EM, PÉREZ-FIGARES JM (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1105-19.
- JOHANSON C, DUNCAN JA, KLINGE PM, BRINKER T, STOPA E, SILVERBERG D (2008) Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Research* 5:10
- JOHANSON C, STOPA E, BAIRD A, SHARMA H (2011) Traumatic brain injury and recovery mechanisms: peptide modulation of periventricular neurogenic regions by the choroid plexus-CSF nexus. *J Neural Transm* 118(1):115-33.
- JONES HC, DACK S, ELLIS C (1987) Morphological aspects of the development of hydrocephalus in a mouse mutant (SUMS/NP). *Acta Neuropathol* 72:268-76.
- JONES HC, BUCKNALL RM, HARRIS NG (1991) The cerebral cortex in congenital hydrocephalus in the H-Tx rat: a quantitative light microscopy study. *Acta Neuropathol* 82:217-24.
- JONES HC, KLINGE PM (2008) Hydrocephalus, 17-20th September, Hannover Germany: a conference report. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:19.
- JONGEN WM, FITZGERALD DJ, ASAMOTO M, PICCOLI C, SLAGA TJ, GROS D, TAKEICHI M, YAMASAKI H (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 114:545-555.
- KAMIGUCHI H, HLAVIN ML, LEMMON V (1998) Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12:48-55
- KAMURO K, TENOKUCHI Y (1993) Familial periventricular nodular heterotopia. *Brain Dev* 15:237-41.
- KAZANIS I, LATHIA J, MOSS L, FFRENCH-CONSTANT C (2008) The neural stem cell microenvironment. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute
- KAZANIS I (2009) The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: how plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed. *Brain* 132:2909-21.
- KIM DE, SCHELLINGERHOUT D, ISHII K, SHAH K, WEISSLEDER R (2004) Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 35:952-7.
- KLEZOVITCH O, FERNANDEZ TE, TAPSCOTT SJ, VASIOUKHIN V (2004) Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice. *Genes Dev* 18:559-71.
- KRUEGER RC, WU H, ZANDIAN M, DANIELPOUR M, KABOS P, YU JS, SUN YE (2006) Neural progenitors populate the cerebrospinal fluid of preterm patients with hydrocephalus. *J Pediatr* 148(3): 337-340.
- LAIRD DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394(Pt 3):527-43.
- MA X, BAO J, ADELSTEIN RS (2007) Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 18:2305-12.
- MALATESTA P, APPOLLONI I, CALZOLARI F (2008) Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331:165-78.
- MARÍN O, RUBENSTEIN JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-90.
- MARÍN O, RUBENSTEIN JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-83.
- MASHAYEKHI F, DRAPER CE, BANNISTER CM, POURGHASEM M, OWEN-LYNCH PJ, MIYAN JA (2002) Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain* 125:1859-74.
- MERKLE FT, ALVAREZ-BUYLLA A (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 18:704-9.
- MEYER RA, LAIRD DW, REVEL JP, JOHNSON RG (1992) Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 119:179-189.
- MIYAN J, SOBKOWIAK C, DRAPER C (2001) Humanity lost: the cost of cortical maldevelopment. Is there light ahead? *Eur J Pediatr Surg* 11 Suppl 1:S4-9.

- MIYAN JA, ZENDAH M, MASHAYEKHI F, OWEN-LYNCH PJ (2006) Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res* 3:2.
- MOLINA-HOLGADO E, MOLINA-HOLGADO F (2010) Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. *J Neurochem* 114(5):1277-90.
- MONTECINOS HA, RICHTER H, CAPRILE T, RODRIGUEZ EM (2005) Synthesis of transthyretin by the ependymal cells of the subcommissural organ. *Cell Tissue Res* 320:487-99.
- MORI T, BUFFO A, GOTZ M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99.
- NADARAJAH B, PARNAVELAS JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-32.
- NECHIPORUK T, FERNÁNDEZ TE, VASIOUKHIN V (2007) Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in *Dlg5*^{-/-} mice. *Dev Cell* 13:338-50.
- NEUHUBER B, BARSHINGER AL, PAUL C, SHUMSKY JS, MITSUI T, FISCHER I (2008) Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. *J Neurosurg Spine* 9:390-9.
- OHTA M, SUZUKI Y, NODA T, KATAOKA K, CHOU H, ISHIKAWA N, KITADA M, MATSUMOTO N, DEZAWA M, SUZUKI S, IDE C (2004) Implantation of neural stem cells via cerebrospinal fluid into the injured root. *Neuroreport* 15:1249-53.
- OKA C, MATSUDA H, SARAI N, NOMA A (2006) Modeling the calcium gate of cardiac gap junction channel. *J Physiol Sci* 56:79-85.
- ORELLANA JA, SÁEZ PJ, SHOJI KF, SCHALPER KA, PALACIOS-PRADO N, VELARDE V, GIAUME C, BENNETT MV, SÁEZ JC (2009) Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 11(2):369-99.
- OWEN-LYNCH PJ, DRAPER CE, MASHAYEKHI F, BANNISTER CM, MIYAN JA (2003) Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain* 126:623-31.
- PÁEZ P, BÁTIZ LF, ROALES-BUJAN R, RODRÍGUEZ-PÉREZ LM, RODRÍGUEZ S, JIMÉNEZ AJ, RODRÍGUEZ EM, PÉREZ-FIGARES JM (2007) Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1082-92.
- PARADA C, GATO A, BUENO D (2005) Mammalian embryonic cerebrospinal fluid proteome has greater apolipoprotein and enzyme pattern complexity than the avian proteome. *J Proteome Res* 4:2420-8.
- PARK IH, ARORA N, HUO H, MAHERALI N, AHFELD T, SHIMAMURA A, LENSCH MW, COWAN C, HOCHEDLINGER K, DALEY GQ (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134:877-86.
- PÉREZ VELÁZQUEZ JL, CARLEN PL (2000) Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci* 23:68-74.
- PLUCHINO S, QUATTRINI A, BRAMBILLA E, GRITTI A, SALANI G, DINA G, GALLI R, DEL CARRO U, AMADIO S, BERGAMI A, FURLAN R, COMI G, VESCOLO AL, MARTINO G (2003) Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422:688-94.
- RASIN MR, GAZULA VR, BREUNIG JJ, KWAN K, JOHNSON M, LIU-CHEN S, LI H, YEH L, JAN Y, SAKIC P, ESTAN N (2007) Numb and *Numb1* are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci* 10:819-27.
- RICCI S, CUSMAI R, FARIELLO G, FUSCO L, VIGEVANO F (1992) Double cortex. A neuronal migration anomaly as a possible cause of Lennox-Gastaut syndrome. *Arch Neurol* 49:61-4.
- RIETZE RL, VALCANIS H, BROOKER GF, THOMAS T, VOSS AK, BARTLETT PF (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412:736-9.
- RODRÍGUEZ EM, RODRÍGUEZ S, HEIN S (1998) The subcommissural organ. *Microsc Res Tech* 41:98-123.
- ROSSER AE, TYERS P, DUNNETT SB (2000) The morphological development of neurons derived from EGF- and FGF-2-driven human CNS precursors depends on their site of integration in the neonatal rat brain. *Eur J Neurosci* 12:2405-13.
- ROUACH N, AVIGNONE E, MÊME W, KOULAKOFF A, VENANCE L, BLOMSTRAND F, GIAUME C (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94(7-8):457-75.
- SÁEZ JC, BERTHOUD VM, BRANES MC, MARTÍNEZ AD, BEYER EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400.
- SÁEZ JC, RETAMAL MA, BASILIO D, BUKAUSKAS FF, BENNETT MV (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1711(2):215-24.
- SARNAT HB (1992) Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 8:163-78.
- SARNAT HB, DARWISH HZ, BARTH PG, TREVENEN CL, PINTO A, KOTAGAL S, SHISHIKURA K, OSAWA M, KOROBKIN R (1993) Ependymal abnormalities in lissencephaly/pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:525-41.
- SATAKE K, LOU J, LENKE LG (2004) Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976)* 29:1971-9.
- SHEEN VL, DIXON PH, FOX JW, HONG SE, KINTON L, SISODIVA SM, DUNCAN JS, DUBEAU F, SCHEFFER IE, SCHACHTER SC, WILNER A, HENCHY R, CRINO P, KAMURO K, DIMARIO F, BERG M, KUZNIECKY R, COLE AJ, BROMFIELD E, BIBER M, SCHOMER D, WHELESS J, SILVER K, MOCHIDA GH, BERKOVIC SF, ANDERMANN E, ANDERMANN E, DOBYNS WB, WALSH CA (2001) Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 10:1775-83.
- SHEEN VL, GANESH VS, TOPCU M, SEBIRE G, BODELL A, HILL RS, GRANT PE, SHUGART YY, IMITOLA J, KHOURY SJ, GUERRINI R, WALSH CA (2004) Mutations in *ARFGEF2* implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet* 36:69-76.
- SIEVERTZON M, WIRTA V, MERCER A, MELETIS K, ERLANDSSON R, WIKSTRÖM L, FRISÉN J, LUNDEBERG J (2005) Transcriptome analysis in primary neural stem cells using a tag cDNA amplification method. *BMC Neurosci* 6:28.
- SIVAL D, GUERRA M, DEN DUNNEN WFA, BÁTIZ LF, ALVIAL G, CASTAÑEYRA-PERDOMO A, RODRÍGUEZ EM (2011) Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol* 21:163-179.
- TAKAHASHI T, NOWAKOWSKI RS, CAVINESS VS, JR (1994) Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:375-9.
- TAKAHASHI T, NOWAKOWSKI RS, CAVINESS VS, JR (1995) Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15:6058-68.
- TULLIO AN, BRIDGMAN PC, TRESSER NJ, CHAN CC, CONTI MA, ADELSTEIN RS, HARA Y (2001) Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol* 433:62-74.
- VIO K, RODRÍGUEZ S, YULIS CR, OLIVER C, RODRÍGUEZ EM (2008) The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:3.
- VIO K, OJEDA A, YULIS R, RODRÍGUEZ EM (2010) The disruption of the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) zones of the ganglionic eminences in hydrocephalic hyh mice is associated to abnormalities in the cortical GABAergic neurons. *Cerebrospinal Fluid Research* 2010, 7 (Suppl 1):S57.
- WAGNER C, BÁTIZ LF, RODRÍGUEZ S, JIMÉNEZ AJ, PÁEZ P, TOMÉ M, PÉREZ-FIGARES JM, RODRÍGUEZ EM (2003) Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1019-40.
- WEI CJ, FRANCIS R, XU X, LO CW (2005) Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 280:19925-19936.
- WEISSMAN IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-68.
- WICHTERLE H, TURNBULL DH, NERY S, FISHELL G, ÁLVAREZ-BUYLLA A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-71.
- WILLIAMS MA, MCALLISTER JP, WALKER ML, KRANZ DA, BERGSNEIDER M, DEL BIGIO MR, FLEMING L, FRIM DM, GWINN K, KESTLE JR, LUCIANO MG, MADSEN JR, OSTER-GRANITE ML, SPINELLA G (2007) Priorities for hydrocephalus research: report from a National Institutes of Health-sponsored workshop. *J Neurosurg* 107:345-57.
- WU S, SUZUKI Y, NODA T, ET AL (2002) Immunohistochemical and electron microscopic study of invasion and differentiation in spinal cord lesion of neural stem cells grafted through cerebrospinal fluid in rat. *J Neurosci Res* 69:940-5.

- YUNG YC, MUTOH T, LIN ME, NOGUCHI K, RIVERA RR, CHOI JW, KINGSBURY MA, CHUN J (2011) Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med* 3(99):99ra87
- ZAPPATERA MD, LISGO SN, LINDSAY S, GYGI SP, WALSH CA, BALLIF BA (2007) A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *J Proteome Res* 6:3537-48.
- ZIV Y, RON N, BUTOVSKY O, LANDA G, SUDAI E, GREENBERG N, COHEN H, KIPNIS J, SCHWARTZ M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268-75.
- ZIV Y, SCHWARTZ M (2008) Orchestrating brain-cell renewal: the role of immune cells in adult neurogenesis in health and disease. *Trends Mol Med* 14:471-8.

MARÍA I. MARTÍNEZ LEÓN

Contents

Case 1	Congenital Hydrocephalus	000
	María Dolores Domínguez-Pinos and Antonio J. Jiménez	
Case 2	Tuberous Sclerosis Complex	000
	Laura Ortiz Terán and Agnies M. Van Eeghen	
Case 3	Pediatric Human Immunodeficiency Virus Encephalopathy	000
	María Dolores Domínguez-Pinos and María I. Martínez León	
Case 4	Acute Cerebellitis Secondary to Rotavirus Infection (ACSRI)	000
	Alberto Muñoz González	
Case 5	Moyamoya Disease	000
	Élida Vázquez Méndez and Ángel Sánchez-Montañez	
Case 6	Pediatric Multiple Sclerosis Revisited	000
	Beatriz Asenjo García	
Case 7	Cystic Craniopharyngioma	000
	Germaine Cartier Velázquez and María I. Martínez León	
Case 8	Obstetric Brachial Plexus Injuries and Magnetic Resonance Imaging	000
	Daniela Binaghi and Mariano Socolovsky	
Case 9	Intradural Lipoma	000
	Carmen Ballesteros-Guerrero and María I. Martínez León	
Case 10	Dumbbell Neuroblastoma	000
	Susana Ramírez Jiménez	

4 **Case 1: Congenital Hydrocephalus**

5 María Dolores Domínguez-Pinos and Antonio J. Jiménez

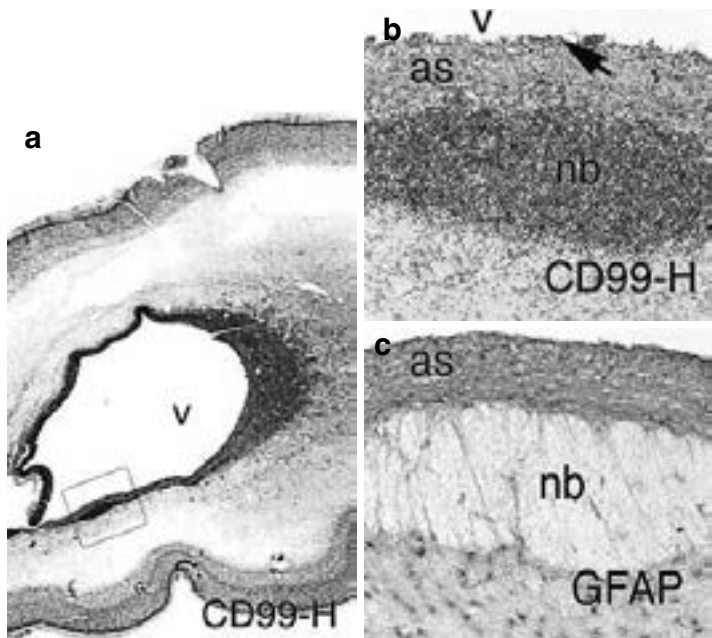


Fig. 1.1

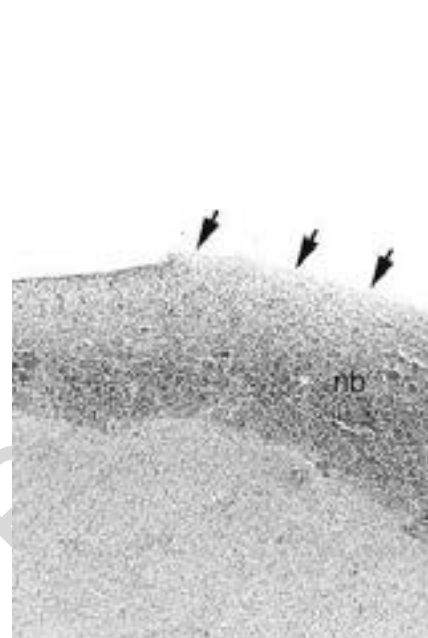


Fig. 1.2



Fig. 1.3

[AU10]

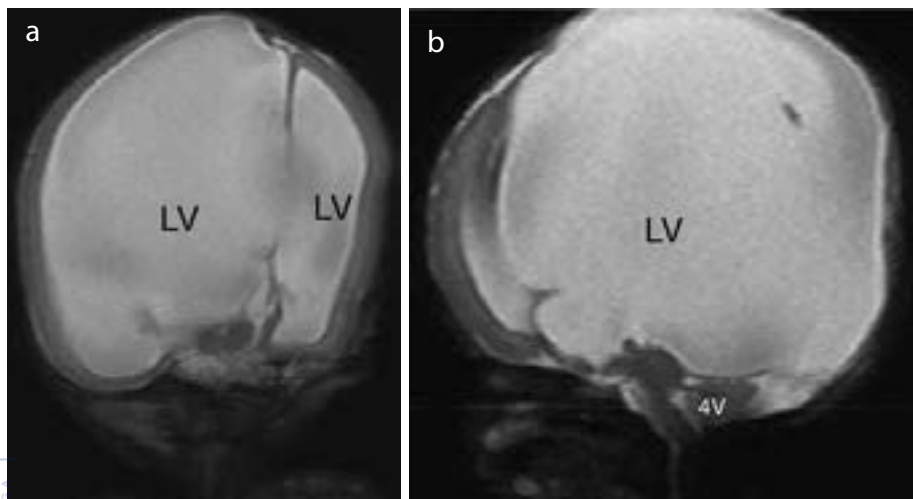


Fig. 1.4

Hydrocephalus is an active distension of the ventricular system of the brain resulting from inadequate passage of cerebrospinal fluid (CSF) from its point of production within the cerebral ventricles to its point of absorption into the systemic circulation. This leads to a net increase of CSF in the cranial cavity and to an increase in the size of the ventricle. It can be originated during the development, with genetic or acquired origins. When there is blockage within the ventricular system, hydrocephalus is called obstructive or non-communicating. In children with hydrocephalus, enlarged ventricles are associated with compression of cortical areas and correlated with cognitive impairment. However, in fetuses with moderate communicating hydrocephalus, the germinal neuroepithelium has been shown to be altered and has also been associated with an abnormal migration of neuroblasts.

Congenital hydrocephalus is detected early in gestational controls by ultrasound. Atrium size greater than 9 mm or ventricular enlargement >1.5 mm on serial examinations and high biparietal diameter are signs of hydrocephalus. Associated findings can also be evaluated with ultrasound and MRI.

Young infant presents irritability, lethargy, vomiting, a full fontanel, and increased head circumference. After 12 months of age, the head circumference changes more slowly, and the diagnosis is based on clinical symptoms.

Insertion of a ventriculoperitoneal shunt represents a lifetime commitment for the child and family. However, the presence of ventriculomegaly alone does not necessarily indicate the need for treatment.

(Fig. 1.1a–c) Section of the telencephalon immunostained with an anti-CD99 and counterstained with hematoxylin (CD99-H). Ventriculomegaly is present in the lateral ventricle (v). The area framed in (a) is detailed in (b and c). Neuroblasts (nb) accumulate near the ventricle and can be present in the surface (*arrow*), which lacks ependyma. Instead of ependyma, the surface is covered with a thick layer of astrocytes (as) that are labeled with anti-CD99 antibodies and glial fibrillary acidic protein (GFAP).

(Fig. 1.2) Section of the telencephalon stained with hematoxylin-eosin showing the existence of areas lacking ependyma (*arrows*). Neuroblasts (nb) have accumulated near the surface denuded of ependyma. (Fig. 1.3a) Hydrocephalus due to aqueductal stenosis: coronal view of fetal MRI: there is enlargement of the lateral ventricles, with third ventricle almost normal. Sagittal and coronal views of cranial ultrasound show dilated lateral ventricles with a 19.4-mm caudothalamic cleft. (Fig. 1.4a, b) Coronal and sagittal views of MRI showing significant cortical thinning with severe dilatation of the ventricles. The fourth ventricle is normal. Findings suggestive of aqueductal stenosis.

Comments

Imaging Findings

BAU1]

503	Civitello LA (1991–1992) Neurologic complications of HIV infection in children. <i>Pediatr Neurosurg</i> 17:104–112	553	Papavasiliou AS, Kotsalis C, Trakadas S (2004) Transient cerebellar mutism in the course of acute cerebellitis. <i>Pediatr Neurol</i> 30:71–74	554
506	de la IMM Sarmiento, Lecumberri Cortés G, Lecumberri Cortés I, Oleaga Zufria L, Isusi Fontan M, Grande Icaran D (2006) Intracranial calcifications on MRI. <i>Radiologia</i> 48:19–26	555	Ramig RF (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. <i>J Virol</i> 78:10213–10220	556
510	Exhenry C, Nadal D (1996) Vertical human immunodeficiency virus-1 infection: involvement of the central nervous system and treatment. <i>Eur J Pediatr</i> 155:839–850	557	Shiihara T, Watanabe I, Honma A et al (2007) Rotavirus associated encephalitis/ encephalopathy and concurrent cerebellitis: report of two cases. <i>Brain Dev</i> 29:670–673	558
514	Gavin P, Yogev R (1999) Central nervous system abnormalities in pediatric human immunodeficiency virus infection. <i>Pediatr Neurosurg</i> 31:115–123	559	Tada H, Takanashi J, Barkovich AJ et al (2004) Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion. <i>Neurology</i> 63:1854–1858	560
517	Ramos JT, de José MI, Polo R, Fortuny C, Mellado MJ, Muñoz-Fernández MA et al (2005) Recommendations of the CEVIHP/SEIP/AEP/PNS on antiretroviral treatment in HIV-infected children and teenagers. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin</i> 23:279–312	561	Takanashi J (2009) Two newly proposed infectious encephalitis/encephalopathy syndromes. <i>Brain Dev</i> 31:521–528	562
522	Safriel YI, Haller JO, Lefton DR, Obedian R (2000) Imaging of the brain in the HIV-positive child. <i>Pediatr Radiol</i> 30:725–732	563		564
525	Sibtain NA, Chinn RJS (2002) Imaging of the central nervous system in HIV infection. <i>Imaging</i> 14:48–59	565		566
527	States LJ, Zimmerman RA, Rutstein RM (1997) Imaging of pediatric central nervous system HIV infection. <i>Neuroimaging Clin N Am</i> 7:321–339	566		567
530	Case 4: Acute Cerebellitis Secondary to Rotavirus Infection (ACSRI)		Case 5: Moyamoya Disease	568
531			Book	569
532	Book		Barkovich AJ (2005) <i>Pediatric neuroimaging</i> , 4th ed. Lippincott & Williams and Wilkins, Philadelphia	570
533	Barkovich AJ (2005) <i>Pediatric neuroimaging</i> , 4th ed. Lippincott & Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 839–840			571
534			Web Link	572
535			http://www.ninds.nih.gov/disorders/moyamoya/moyamoya.htm	573
536	Web Link			574
537	http://www.slideshare.net/yassermetwally/short-case-postinfectious-cerebellitis-presentation			
538			Articles	575
539	Articles		Fujita K, Tamak N, Matsumoto S (1986) Surgical treatment of moyamoya disease in children: which is the more effective procedure, EDAS or EMS? <i>Childs Nerv Syst</i> 2:134–138	576
540	Dimova P, Bojinova VS, Milanov IG (2009) Transient mutism and pathologic laughter in the course of cerebellitis. <i>Pediatr Neurol</i> 41:49–52		Lee SK, Kim DI, Jeong EK, Kim SY, Kim SH, In YK et al (2003) Postoperative evaluation of moyamoya disease with fusion-weighted MR imaging: initial experience. <i>AJNR Am J Neuroradiol</i> 24:741–747	577
541			Lee M, Zaharchuk G, Guzman R, Achrol A, Bell-Stephens T, Steinberg GK (2009) Quantitative hemodynamic studies in moyamoya disease: a review. <i>Neurosurg Focus</i> 26(4):E5	578
542	Fukuda S, Kishi K, Yasuda K et al (2009) Rotavirus-associated encephalopathy with a reversible splenial lesion. <i>Pediatr Neurol</i> 40:131–133		Pandey P, Steinberg GK (2011) Neurosurgical advances in the treatment of moyamoya disease. <i>Stroke</i> 42:3304–3310	579
543			Suzuki J, Takaku A (1969) Cerebrovascular “moyamoya” disease: a disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. <i>Arch Neurol</i> 20:288–299	580
544	Lynch M, Lee B, Azimi P et al (2001) Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. <i>Clin Infect Dis</i> 33:932–938		Yamada I, Matsushima Y, Suzuki S (1992) Moyamoya disease: diagnosis with three-dimensional time-of-flight MR angiography. <i>Radiology</i> 184:773–778	581
545			Yamada I, Suzuki S, Matsushima Y (1995) Moyamoya disease: comparison of assessment with MR angiography and MR imaging versus conventional angiography. <i>Radiology</i> 196:211–218	582
546	Mewasingh LD, Kadhim H, Christophe C et al (2003) Nonsurgical cerebellar mutism (anarthria) in two children. <i>Pediatr Neurol</i> 28:59–63		Yonekawa Y, Goto Y, Ogata N (1986) Moyamoya disease: diagnosis, treatment, and recent achievement. <i>Stroke</i> 17:805–829	583
547				584
548				585
549				586
550				587
551				588
552				589
				590
				591
				592
				593
				594
				595
				596
				597
				598
				599
				600
				601
				602
				603

Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF α) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the *hyh* mouse

A.-J. Jiménez*, L.-M. Rodríguez-Pérez*, M.-D. Domínguez-Pinos*, M.-C. Gómez-Roldán*, M. García-Bonilla*, A. Ho-Plagaro*, R. Roales-Buján*, S. Jiménez†‡, M.-C. Roquero-Mañueco*, M.-I. Martínez-León§, M.-L. García-Martín¶, M. Cifuentes*, B. Ros**, M.-Á. Arráez**, J. Vitorica†‡, A. Gutiérrez*‡ and J.-M. Pérez-Fígares*

*Department of Cell Biology, Genetics, and Physiology, Faculty of Sciences, University of Malaga, Malaga, †Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, ‡Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, §Neurodiagnostic Section, Department of Paediatric Radiology, University Regional Hospital Carlos Haya, Malaga, ¶Nanoimaging Unit, Bionand, Malaga, and **Paediatric Neurosurgery Section, Department of Neurosurgery, University Regional Hospital Carlos Haya, Malaga, Spain

A.-J. Jiménez, L.-M. Rodríguez-Pérez, M.-D. Domínguez-Pinos, M.-C. Gómez-Roldán, M. García-Bonilla, A. Ho-Plagaro, R. Roales-Buján, S. Jiménez, M.-C. Roquero-Mañueco, M.-I. Martínez-León, M.-L. García-Martín, M. Cifuentes, B. Ros, M.-Á. Arráez, J. Vitorica, A. Gutiérrez and J.-M. Pérez-Fígares (2014) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40, 911–932

Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF α) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the *hyh* mouse

Aims: Here, we tested the hypothesis that glial responses via the production of cytokines such as transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) and tumour necrosis factor alpha (TNF α), which play important roles in neurodegenerative diseases, are correlated with the severity of congenital hydrocephalus in the *hyh* mouse model. We also searched for evidence of this association in human cases of primary hydrocephalus. **Methods:** *Hyh* mice, which exhibit either severe or compensated long-lasting forms of hydrocephalus, were examined and compared with wild-type mice. TGF β 1, TNF α and TNF α R1 mRNA levels were quantified using real-time PCR. TNF α and TNF α R1 were immunolocalized in the brain tissues of *hyh* mice and four hydrocephalic human fetuses relative to astroglial and microglial reactions. **Results:** The TGF β 1 mRNA levels were not significantly different between *hyh*

mice exhibiting severe or compensated hydrocephalus and normal mice. In contrast, severely hydrocephalic mice exhibited four- and two-fold increases in the mean levels of TNF α and TNF α R1, respectively, compared with normal mice. In the *hyh* mouse, TNF α and TNF α R1 immunoreactivity was preferentially detected in astrocytes that form a particular periventricular reaction characteristic of hydrocephalus. However, these proteins were rarely detected in microglia, which did not appear to be activated. TNF α immunoreactivity was also detected in the glial reaction in the small group of human fetuses exhibiting hydrocephalus that were examined. **Conclusions:** In the *hyh* mouse model of congenital hydrocephalus, TNF α and TNF α R1 appear to be associated with the severity of the disease, probably mediating the astrocyte reaction, neurodegenerative processes and ischaemia.

Keywords: biomarkers, congenital hydrocephalus, microglia, reactive astrocyte, TGF β 1, TNF α

Correspondence: Antonio-J Jiménez, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos, Universidad de Málaga, E-29071-Málaga, Spain. Tel: +34 952 133 343; Fax: +34 952 132 000; E-mail: ajjimenez@uma.es

© 2013 British Neuropathological Society

911

Introduction

Tumour necrosis factor alpha (TNF α) is a multifunctional cytokine that exerts a wide range of pleiotropic effects, such as proliferative responses to inflammation, mediation of immune responses and cell death [1]. Thus, TNF α plays a critical role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases [2,3], including multiple sclerosis [4–6], Parkinson's disease and Alzheimer's disease [7–9]. TNF α has two active forms: one is a transmembrane signalling molecule with juxtacrine action [10] and the other is a soluble cytokine [1]. The soluble form is derived from the proteolytic cleavage of the transmembrane form [11]. The activities of the two forms of TNF α are mediated through two different receptors: TNF α R1 (p55) and TNF α R2 (p75). Whereas the transmembrane form of TNF α activates both TNF α R1 and TNF α R2, the soluble form of TNF α primarily functions via binding to TNF α R1 [12,13]. The soluble form of TNF α can induce a pro-inflammatory or cytotoxic effect, inducing cell death through two different signalling pathways mediated by the TNF α R1 receptor [1,14]. However, TNF α can perform dual roles and can be either neurotoxic or neuroprotective in a concentration-dependent manner [15]. These dual roles have also been linked with the activated receptor types [16]. In neural tissue, TNF α is produced by microglia, astrocytes, neurones and infiltrating immune cells [5,17–23], where it activates astrocytic and microglial responses [24,25].

Transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) plays a protective role in neuropathologies [26]. It has been reported to be able to promote axonal regeneration in the hippocampus *in vitro* [27], and it protects hippocampal neurones after global cerebral ischaemia [28], where TGF β 1 has been reported to be secreted by microglia [29,30].

The *hyh* mutant (hydrocephalus with hop gait) [31] mouse is an animal model that exhibits congenital hydrocephalus and develops neuropathological events [32,33], which has made this model valuable for the study of the disease. One of the advantages of this model is that it enables the design of clinical studies in populations of animals with an identical genetic background [34] because the mutation displays a 100% penetrance [35]. Bátiz *et al.* [34] have reported the existence of different forms of the evolution of hydrocephalus in *hyh* mice. Although most *hyh* mice die within a month after developing a severe form of hydrocephalus, 30% of *hyh* mice

develop a long lasting and compensated form of the disease and are able to survive longer.

Here, we have investigated the possible relationship between expression of two different cytokines with pro-inflammatory and neuroprotective properties, TNF α and TGF β 1, and congenital hydrocephalus. *Hyh* mice with both the severe and long-lasting evolutionary forms of congenital hydrocephalus, as well as human foetuses, were examined in the present investigation. The information obtained could provide insight into the pathophysiology and prognosis of hydrocephalus and could facilitate the development of novel pharmacological therapeutic strategies for the disease.

Materials and methods

Animals

Mutant *hyh* mice (hydrocephalus with hop gait, B6C3Fe-a/a-*hyh*/J strain) and their control littermate wild-type (wt) mice were used. Mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were bred in the Animal Experimentation Service of the University of Malaga. The housing, handling, care and processing of the animals were conducted in accordance with European and Spanish laws (DC 86/609/CEE and RD 1201/2005) and followed the regulations approved by the Council of the American Physiological Society. Wt and mutant *hyh* male mice were used and identified by clinical inspection and genotyping [35]. Animals at 4, 7, 30, 90 and 180 (P4–P180) days of age were sacrificed, using cervical dislocation for RT-PCR (P30, P90 and P180 mice) or anaesthetization with Doletal (sodium pentobarbital; Vétoquinol, Lure, France; intraperitoneal administration, 0.2 mg/g bodyweight) for immunocytochemistry/immunofluorescence processing (P4, P7, P30 and P90 mice). For magnetic resonance (MR) studies, P7, P30 and P90 mice were anaesthetized with 1–2% isoflurane in oxygen at 1 l/min.

Human foetuses

Paraffin sections (5–10 μ m thick) of brains necropsies were obtained from four foetuses that exhibited primary hydrocephalus associated with cerebral malformation ($n = 1$; 30 weeks of gestation), non-immune hydrops foetalis (Noonan) ($n = 1$; 36 weeks of gestation), Potter IIB

syndrome and associated hydrocephalus ($n = 1$; 40 weeks of gestation) or Dandy-Walker syndrome ($n = 1$; 40 weeks of gestation). Necropsy specimens from three other foetuses without any neuropathological indications were chosen as controls and included one case each of Potter syndrome without neuropathologies ($n = 1$; 21 weeks of gestation), placental abruption ($n = 1$; 29 weeks of gestation) and anoxia ($n = 1$; 33 weeks of gestation). Foetuses were obtained between 1991 and the present date by induced abortion with a clinical prescription and according to national laws and regulations. The brains of the foetuses were originally obtained for diagnostic purposes with parental consent at the Carlos Haya Hospital (Malaga, Spain) and were fixed in 5% formalin. The medical ethics committee approved their use and study in accordance with Spanish legislation (Data Protection Act, BOE 298, 15/1999; Biomedical Research Act, BOE 159, 14/2007; Regulation of the Use of Samples of Human Origin for Biomedical Research Act, BOE 290, RD1716/2011).

MR imaging

The MR imaging experiments were performed using a 9.4T Biospec 94/20 USR (Bruker, Billerica, MA, USA) small animal system equipped with 440 mT/m gradients. Body temperature and respiratory frequency were monitored in the anaesthetized animals throughout the experiment. The protocol consisted of a high-resolution T2-weighted RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) sequence with fat suppression, 3D FISP (Fast Imaging with Steady Precession) and volumetric T1-weighted multi-slice-multi-echo sequence with water and fat suppression. Sequence parameters were set as follows. T2-weighted: TR = 2.5 s; effective TE = 32 ms; echo train length = 6; 4 averages; matrix size = 512 \times 512; FOV = 20 \times 20 mm²; slice thickness = 0.75 mm. 3D FISP: TR = 8 ms, TE = 4 ms, matrix size = 256 \times 256 \times 128; resolution = 78 μ m \times 78 μ m \times 156 μ m. T1-weighted: TR = 500 ms; TE: 6.6 ms; matrix size = 256 \times 256; FOV = 20 \times 20 mm². One wt mouse at P7, four wt mice at P30, one hyh mouse at P7, six hyh mice at P30 and six hyh mice at P90 were examined using these protocols. Some of the animals were injected with 5 μ l (wt mice) or 10 μ l (hyh mice) of 0.25 mmol/ml Gadovist (Bayer, Leverkusen, Germany) as a contrast agent at a rate of 1 μ l/min into the lateral

ventricle (wt mice) or dorsal third ventricle (hyh mice). After the injection, the needle was maintained in the injection site for 2 min, and volumetric T1 images were obtained 10 and 20 min later.

Immunocytochemistry and immunofluorescence

Wt and hyh mice at P4, P7, P30 and P90 (for each condition: $n = 8$ –12 at P4, P7 and P30, and $n = 5$ at P90) were transcardially perfused with either 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, or Bouin's fixative. Fixed brains were removed and post-fixed in the same solution for 24 h (paraformaldehyde, at 4°C) or 48–72 h (Bouin, at room temperature). Paraformaldehyde-fixed brains were cryoprotected in 30% sucrose to obtain frozen sections (40 μ m thick) that were later immunostained with a free-floating section-staining protocol. Bouin-fixed brains were embedded in paraffin, and 10- μ m-thick serial sections were obtained. Some of the paraffin sections were stained with haematoxylin-eosin. Primary antibodies were used against: TNF α (Abcam, Cambridge, UK, ab34719, rat monoclonal, 1:100 dilution; Abcam, ab1793, mouse monoclonal, 1:100 dilution; Sigma, St Louis, MO, USA, T8300, rabbit polyclonal antibody, 1:200 dilution); TNF α R1 (Sigma, SAB4502988, rabbit polyclonal, 1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA, SC7895, rabbit polyclonal, 1:2000 dilution); GFAP (Sigma, G3893, mouse monoclonal, 1:1000 dilution); Iba1 (Wako, Chuo-ku, Osaka, Japan, 019-19741, rabbit polyclonal, 1:500 dilution), a marker of resting and activated microglia; vimentin (Sigma, V4630; goat polyclonal, 1:500 dilution); and tubulin β IV (Sigma, T7941, mouse monoclonal, 1:400 dilution).

For light microscopy of mouse and human paraffin sections, labelling with primary antibodies was visualized using appropriate secondary biotinylated antibodies, followed by ExtrAvidin-peroxidase (Sigma, 1:2000 dilution) using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) as the electron donor. Ammonium nickel sulphate was added to intensify the DAB reaction, which changed from brown to a dark blue colour. In the paraffin sections, heat-induced antigen retrieval was performed in 50 mM citrate buffer at pH 6.0 prior to immunolabelling.

For immunofluorescence in mouse frozen sections and human paraffin sections, Alexa Fluor 488 and 568 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA, 1:2000 dilution) conjugated secondary antibodies were used. Sections

intended for immunofluorescence were mounted in Vectashield (Dako, Glostrup, Denmark). Nuclear counterstaining was obtained using DAPI. In some sections, double immunostaining was performed, combining two primary antibodies. Serial 1- μm -thick planes and projections in the Z-axis were imaged using a Leica SP5 II (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscope, and the images were processed using ImageJ software (NIH, USA). Micrographs for analysis were obtained under identical conditions.

For all immunostaining, antibodies were diluted in a 0.01 M phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, containing Triton-X100, bovine albumin and appropriate normal sera. Primary antibody incubations were performed at 22°C for 18 h or for 72 h at 4°C, and secondary antibody and ExtrAvidin incubations were performed for 1 h at room temperature. For negative controls, the omission of primary antibodies was used. Immunolabelling was always performed simultaneously and under identical conditions on sections corresponding to both wt mice and hyh mice of different disease severities. Experiments were repeated at least twice by different researchers, and the results were compared for their consistency.

Tomato lectin histochemistry

Tomato lectin was used as a microglia marker, and strong staining identifies amoeboid microglial cells [36]. Paraffin sections were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinylated tomato lectin (*Lycopersicon esculentum*; Vector, Burlingame, CA, USA) in PBS for 1 h at 37°C. The sections were then processed using ExtrAvidin and DAB, as for immunocytochemistry.

Retrotranscription and real-time PCR

The hippocampi of the right hemisphere of wt (P30, $n = 18$; P90, $n = 8$; P180, $n = 2$) and hyh (P30, $n = 13$; P90, $n = 7$; P180, $n = 2$) mice were quickly removed under cold conditions, frozen in dry ice and stored at -84°C . Total RNA was extracted using the Tripure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland). Contaminating DNA was removed via incubation with DNAase (Sigma), and DNA removal was confirmed by the PCR analysis of total RNA prior to reverse transcription. The integrity of the RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm of ethanol-precipitated aliquots of

the samples. The recovery of RNA was comparable between all groups. The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, and rotated overnight at room temperature.

Retrotranscription was performed using random hexamers, 3 μg of total RNA as the template and the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. For real-time RT-PCR, each specific gene product was amplified using commercial Taqman probes [20 \times Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix: GAPDH, Ref. Mm99999915_g1; TNF α , Ref. Mm00443258_m1; TNF α R1, Ref. Mm00441875_m1; and inducible nitric oxide synthase (iNOS), Ref. Mm00440485_m1], following the instructions provided by the manufacturer (Applied Biosystems), and specific primers (TGF β 1: UP 5'TGGAGCAACATGTGGAACCTC3', LO 5'CAGCAGCCGGTTACCAAG3'; and GFAP: UP 5'CTCCAACCTCCAGATCCGAG3', LO 5'TCTGACACGGA TTTGGTGTC3'). For real-time detection and quantification, an ABI Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems) was used. For each assay, a standard curve was first constructed, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slopes of the curves indicated optimal PCR conditions (slopes of 3.2–3.4). The mRNA levels of the different mice were determined using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeper gene. Amplification of the housekeeper gene was performed in parallel with the gene to be analysed. The results were normalized to GAPDH expression. The results were always expressed using the comparative Ct method, following the instructions from Applied Biosystems. As a control condition, we selected the P30 wt mouse. Consequently, the expression levels of all tested genes, for all ages and types of mice, were referenced against the expression levels detected in the P30 wt mouse.

Flow cytometry

The hippocampi from both hemispheres of wt ($n = 22$) and hyh ($n = 17$) mice at P30 were quickly removed under cold conditions and converted into single-cell suspensions in PBS containing 0.1% Triton-X100 using a micropipette. The cells were pelleted after centrifugation and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Following fixation, 200 μl of the cell suspension was incu-

bated with mouse anti-GEAP (1:1000 dilution) or anti-Iba1 (1:1000 dilution) for 24 h at 4°C and then incubated with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:1000 dilution) for 1 h at 4°C. All antibodies were diluted in PBS containing 0.05% Triton-X100. Researchers were blinded by using unlabelled tubes containing samples with or without secondary antibodies. Between 60 000 and 100 000 events were counted for each sample using a Dako Cytomation MoFlo cell sorter (Dako, Glostrup, Denmark). Each experiment was repeated at least twice, and the results were compared for consistency. This method allowed us to estimate the number of cell bodies and intensity of Iba1 microglial cell body immunolabelling in controls and under different hydrocephalic conditions.

Data analyses

Statistical analyses and graphics were generated using KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) and Microsoft Excel 12.2.4 (Microsoft Corporation). A $P < 0.05$ based on Student's t -test was considered statistically significant. When F probability from Student's t -test was < 0.05 variance was considered to be unequal.

Results

Progressive morphological changes in hydrocephalic hyh mice brains

In almost all the mutant hyh mice, the pathology causing their deaths occurred approximately 20–40 days after birth, which is consistent with the results described by Bátiz *et al.* [34]. The mice used for the present study at P30 exhibited the severe form of the disease according to Bátiz *et al.* [34]. At that stage, most animals appeared to be seriously ill, and they were perceived as being susceptible to death within days. In contrast, a few male hyh mice were able to survive to 90 days (P90) and, in extremely rare cases, 180 days (P180) post-partum. Thus, while the very small numbers of hyh mice surviving to P180 caused the results involving these mice to lack statistical significance, they were nevertheless useful for confirming and strengthening the data from the hyh mice surviving to P90. The P90 and P180 mice, while displaying the symptoms described by Bronson and Lane [31], exhibited symptoms that did not appear to be critical, and these mice lacked macrocephaly, consistent with

the evidence described by Bátiz *et al.* [34]. The P90 and rare P180 mice used in this study were collected over a 4-year period and were considered to exhibit a compensated form of hydrocephalus.

In hyh mutant mice between 4 (P4) and 7 (P7) days of age, shortly after closure of the caudal cerebral aqueduct [37], hydrocephalus was found to become severe (Figure 1a), affecting the neocortex and hippocampus (Figure 1e–g). MR imaging (Figure 1h–k) was performed on a small number of mice to confirm the histological results. It was found that macrocephaly was more pronounced in most of the mice that exhibited the severe form of hydrocephalus (P30 mice in the present study). Histological and MR examinations revealed that the mice with severe hydrocephalus and macrocephaly (P30 hyh mice) exhibited a larger dilatation of the dorsal third ventricle and of the caudal cerebral aqueduct than mice that developed the long-lasting form of hydrocephalus lacking macrocephaly (P90 and P180 mice). Histological analysis of all hyh revealed periventricular oedema in the neocortex, as well as degeneration of the fibres of the external capsule, during the first week of life (Figure 1f,g; wt condition is shown in Figure 1b–d).

The presence of periventricular astrocytic reactions in the hyh mouse

A characteristic periventricular astrocyte reaction, described previously [33,38,39], was detected covering the ventricle surfaces lacking an ependyma in the bulk of the ventricular system, including the alveus of the hippocampus (Figure 2b; compared with the wt mouse in Figure 2a). These cells appeared to be strongly GEAP immunoreactive (Figure 2b) and were also vimentin positive (not shown), strongly suggesting that the cells were mature reactive astrocytes, in accordance with previously published results [33]. The levels of GEAP mRNA in the hippocampus of hyh mice at P30 and P90 were quantified and were found to be at least two-fold greater than the levels detected in wt mice (Figure 2c). However, there were no significant differences detected between hyh mice at P30 and P90. The mature hippocampus was selected for mRNA quantification instead of the neocortex for two main reasons. First, the use of hippocampal tissue avoided any possible residual effects of the dramatic oedematous conditions and massive inflammation of the periventricular white matter that occurred during neocortical development [33]. Second, the improper

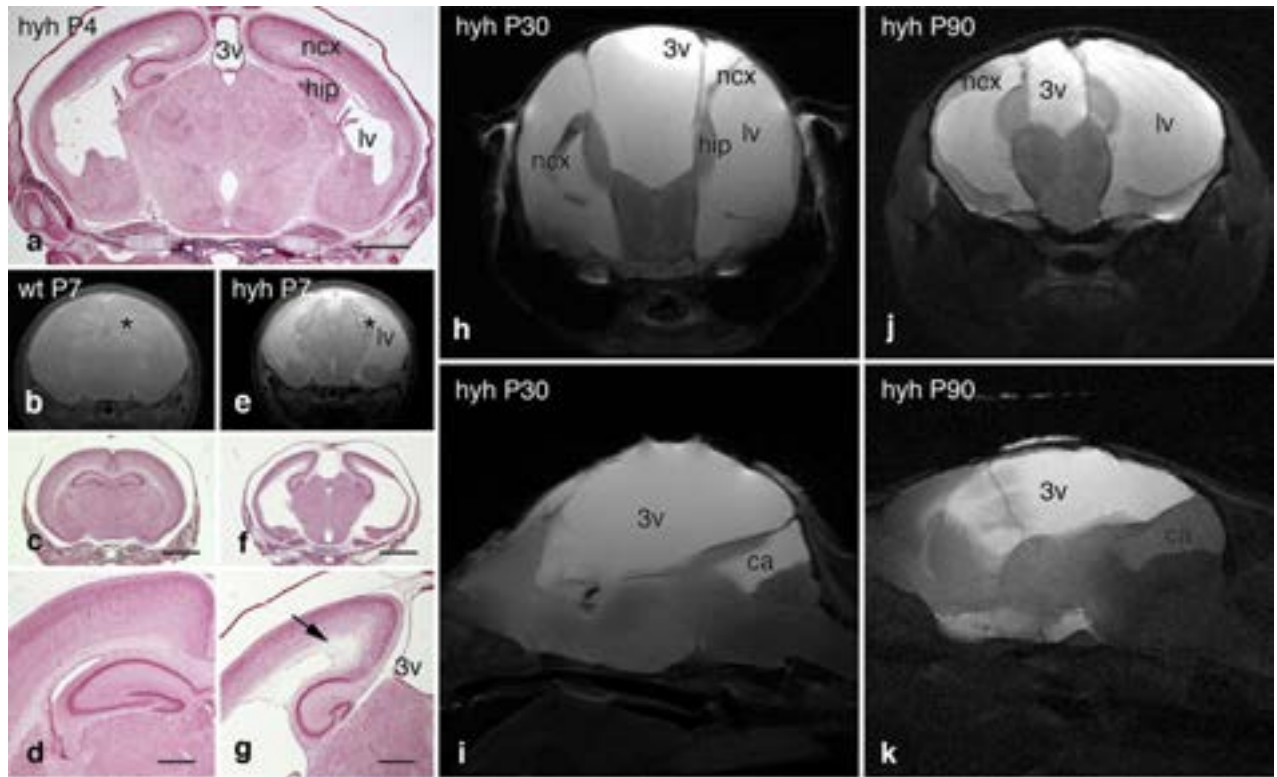


Figure 1. The development of hydrocephalus and ventricle enlargement in hyh mice. (a) A frontal section of a hyh mouse at P4 exhibiting mild enlargement of the lateral ventricles. (b, e) Frontal MR images at the level of the hippocampus (asterisks) of wt and hyh mice at P7. (c, d, f, g) Frontal sections stained with haematoxylin-eosin corresponding to the same wt (c, d) and hyh (f, g) mice at similar levels to those shown in b and e. d and g are detailed images of c and f respectively. The arrow in g indicates the oedematous periventricular region in the neocortex. (h–k) Frontal (h, j) and sagittal (i, k) images from hyh mice at P30 (h, i) and P90 (j, k). h and j are T2 MR images. i and k are T1 MR images at the midline level after the intraventricular injection of a contrast agent. Abbreviations: 3v, third ventricle; ca, dilated caudal cerebral aqueduct; hip, hippocampus; lv, lateral ventricle; ncx, neocortex. Scale bars: a, c, f, 1 mm; d, g, 500 μ m.

development of the neocortex [33] could provide less reliable results than the hippocampus.

hyh mice with different severities of hydrocephalus did not exhibit significant differences in TGF β 1 mRNA expression

To examine whether TGF β 1 could be related to the different magnitudes of hydrocephalus in the hyh mice, the mRNA levels of TGF β 1 in the hippocampus were quantified. No significant differences in the levels of TGF β 1 in the hippocampus were detected between hyh and wt mice at any age (P30, P90 and P180) examined (Figure 2d).

Significant differences in the levels of TNF α mRNA expression between hyh mice with different severities of hydrocephalus

Examination of the association of TNF α expression levels with the aetiology of hydrocephalus of different severities

in the hyh mice was performed as described for TGF β 1. In contrast to TGF β 1, we found that the levels of TNF α mRNA at P30 were significantly different in hyh mice compared with the levels of TNF α mRNA detected in wt mice. There was a four-fold increase in the mean level of TNF α mRNA in hyh mice (Figure 3a), and in some cases, the expression levels were up to eight-fold greater than those found in wt mice. Although the mean TNF α mRNA expression levels in hyh mice at P90 and P180 were found to be two-fold greater than those observed in wt mice, the difference was not significant (Figure 3a).

The expression of TNF α in reactive astrocytes in the hyh mouse and in human foetuses with hydrocephalus

The expression pattern of TNF α was examined by immunolabelling frozen sections of the mouse brain-cortex with three different antibodies. All of the

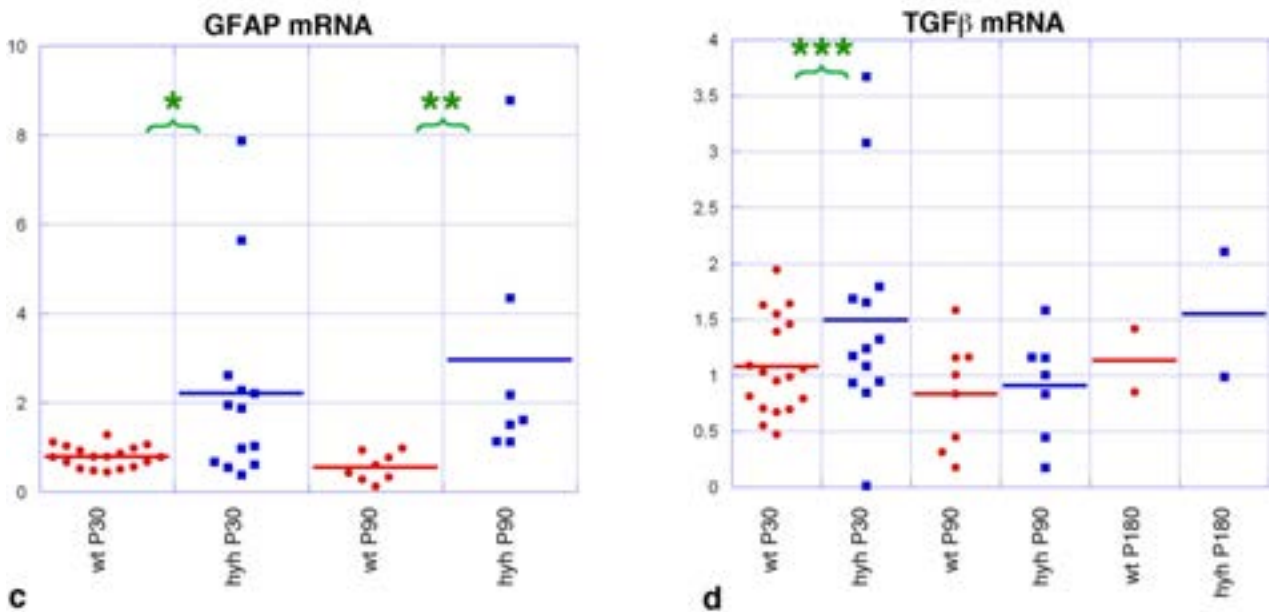
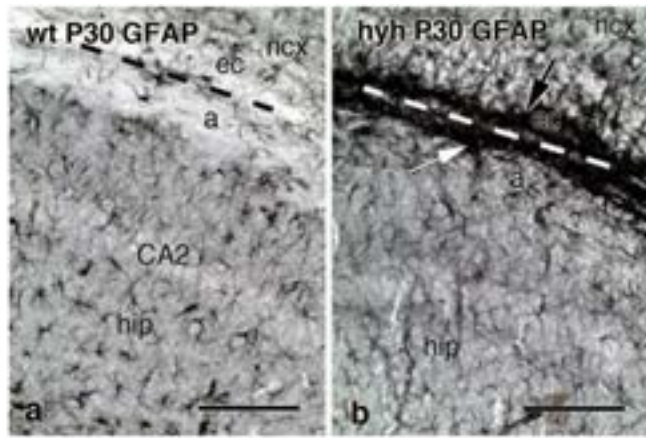


Figure 2. The expression of GFAP and TGF β 1 in the cerebral cortex of hyh and wt mice. (a, b) Immunolabelling with nickel intensification of astrocytes against GFAP in the hippocampus (hip) of a wt (a) and a hyh (b) mouse at P30. Strongly immunoreactive astrocytes are detected covering the ventricle surfaces of the hippocampus (white arrow, in b) and the external capsule below the neocortex (ncx; black arrow, in b) of the hyh mouse. The broken lines in a and b denote the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. (c, d) GFAP (c) and TGF β 1 (d) mRNA levels in the hippocampus of wt (red dots) and hyh mice (blue dots) at P30, P90 and P180. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Significant differences were detected in the levels of GFAP mRNA between wt and hyh mice (* P < 0.02, Student's t -test, unpaired data with unequal variance, F probability < 0.003; ** P < 0.02, Student's t -test, unpaired data with unequal variance, F probability < 0.0001) but not in the levels of TGF β 1 mRNA between wt and hyh mice at P30 (** P < 0.6, Student's t -test, unpaired data with equal variance, F probability < 0.5). Abbreviations: a, alveus; CA2; pyramidal cells of Cornu Ammonis area 2; ec, external capsule. Scale bars: a, b, 50 μ m.

antibodies revealed similar results. During the first days of postnatal life in wt and hyh mice, TNF α immunoreactivity was only detected in the meninges and in a diffuse form in the neighbouring brain parenchyma (Figure 4a–e). Later, at the end of the first postnatal week in hyh mice, as hydrocephalus became severe, it was also possible to detect diffuse TNF α immunoreactivity throughout the brain parenchyma (Figure 4f–k). In agreement with the results obtained from real-time PCR, the diffuse TNF α immunoreactivity could be detected more strongly in the sections from hyh mice at P30 (Figure 5b,c,f) than from wt mice at P30 (Figure 5a,e) or hyh mice at P90 (Figure 5d).

Periventricular reactive astrocytes were found to be immunoreactive to the different TNF α antibodies in hyh mice from P7 onwards. TNF α immunolabelling was detected in the reactive astrocytes in the neocortex and the

alveus of the hippocampus (Figures 4f,g and 5f–i), as well as other ventricle surfaces (not shown). The patches of ependymal cells that resisted the process of denudation did not display TNF α immunoreactivity (Figure 5j). TNF α immunoreactivity was not detected in the cell bodies or the primary cell processes of the nonreactive astrocytes located inside the brain parenchyma (Figure 5g). Some Iba1+ periventricular microglia on the ventricle surface of the neocortex (Figure 5l) and, unusually, in the hippocampus displayed immunoreactivity to TNF α antibodies (Figure 5k).

Periventricular reactive astrocytes immunolabelled with anti-TNF α were not detected in the human control cases (Figure 6a). In neocortical sections of human foetuses with primary hydrocephalus, anti-TNF α -labelled reactive astrocytes in the periventricular region covered

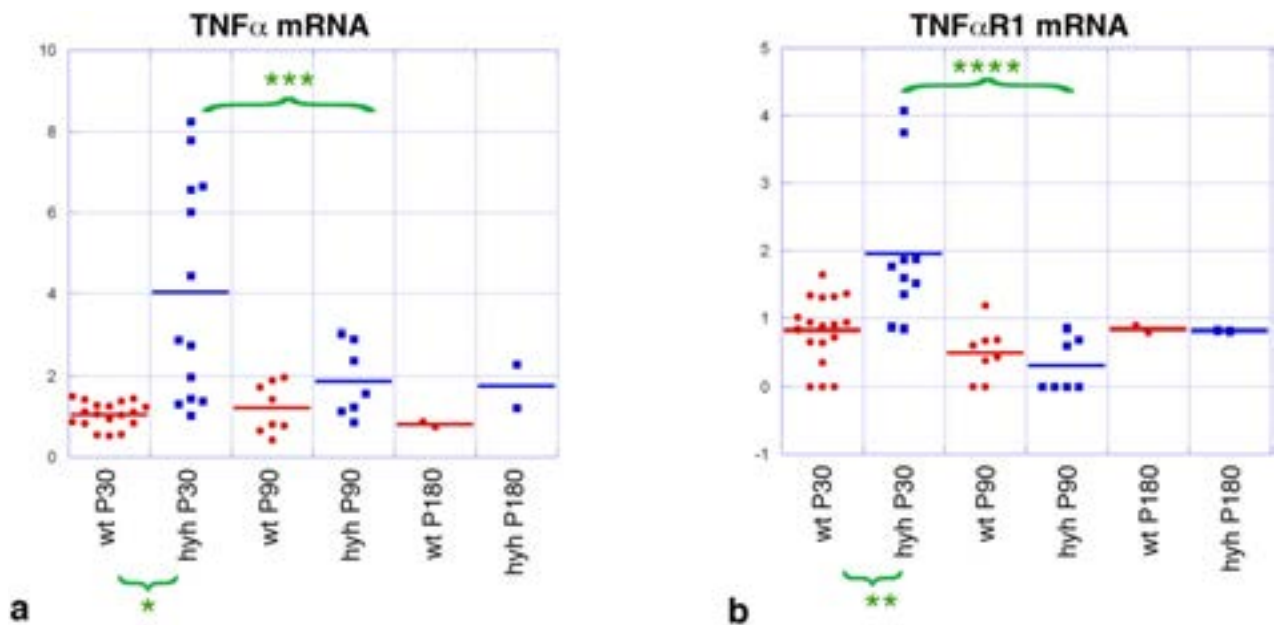
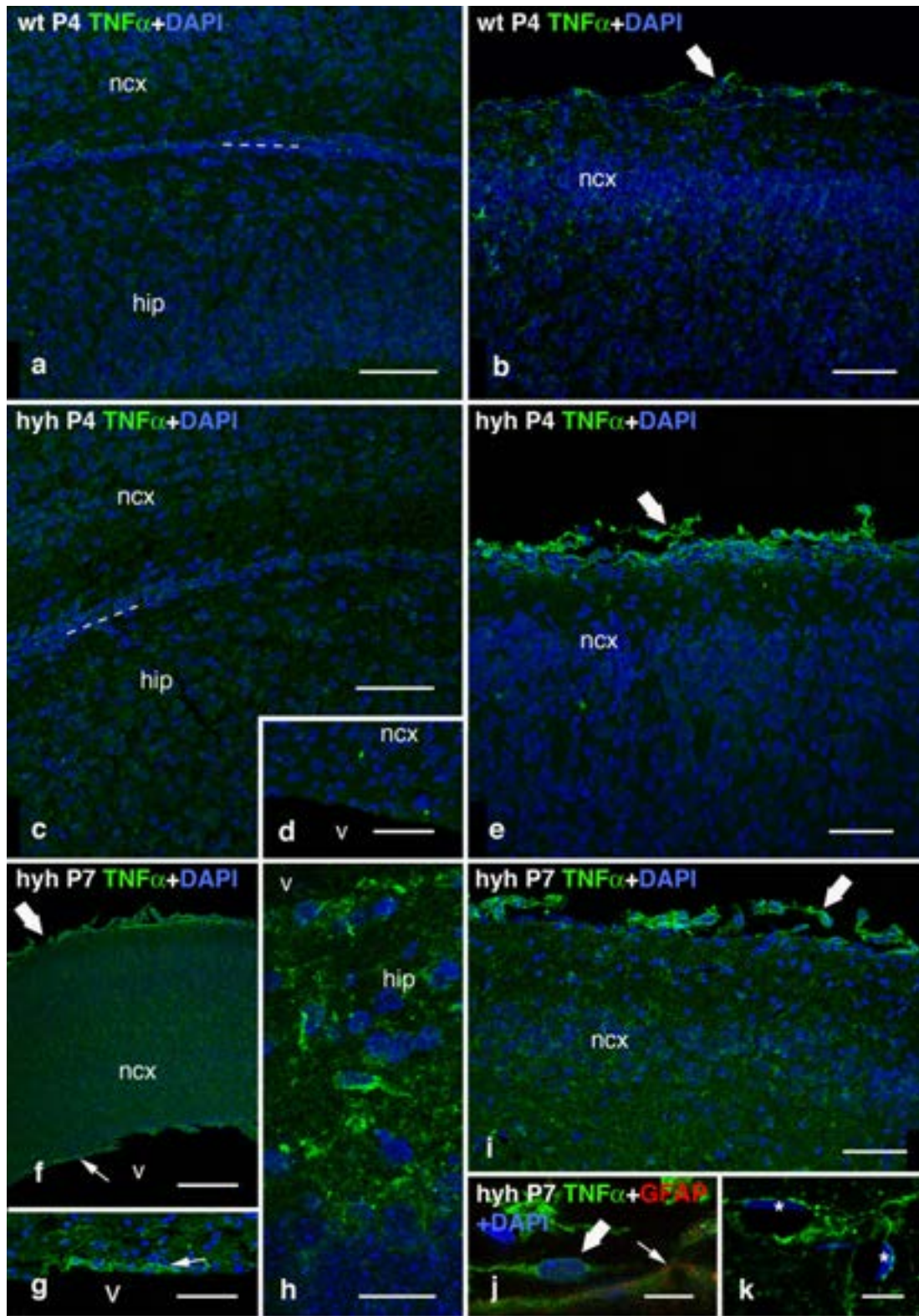


Figure 3. mRNA levels of TNF α (a) and its receptor, TNF α R1 (b), in the hippocampus of wt (red dots) and hyh (blue dots) mice at P30, P90 and P180. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Correlation analyses revealed significant differences between wt and hyh mice at P30 and between hyh mice at P30 and P90 (* P < 0.002, ** P < 0.01, *** P < 0.02, **** P < 0.001; Student's t -test, unpaired data with unequal variance, * F probability < 0.0001, ** F probability < 0.004, *** F probability < 0.02, **** F probability < 0.02). The correlation probability was high (0.004) for the levels of TNF α and TNF α R1 in each animal.

Figure 4. (a–k) TNF α expression in the neocortex (ncx; a–g, i–k) and hippocampus (hip; a, c, h) of wt (a, b) and hyh mutant mice (c–k) at P4 (a–e) and P7 (f–k). Confocal microscopy of sections immunostained using rabbit anti-TNF α antibodies (TNF α , green) and counterstained using the nuclear marker DAPI (blue). Immunoreactivity was detected in a diffuse pattern in the brain parenchyma and in the cells of the meninges (thick arrows; in b, e, f, i, j). TNF α labelling was also detected in astrocyte cell bodies and their endfeet in the glial limitans (thin arrow, in j; colabelling with GFAP in red) as well as in reactive astrocytes in the ventricular surface (thin arrows, in f and g). The broken line in a and c denotes the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. TNF α immunoreactivity was detected in the astrocyte perivascular endfeet surrounding blood vessels near the meninges (asterisks, in k) and the ventricle in the neocortex. Abbreviations: v, lateral ventricle lumen. Scale bars: a–e, g, i, 50 μ m; h, 25 μ m; j, 10 μ m; k, 7.5 μ m.



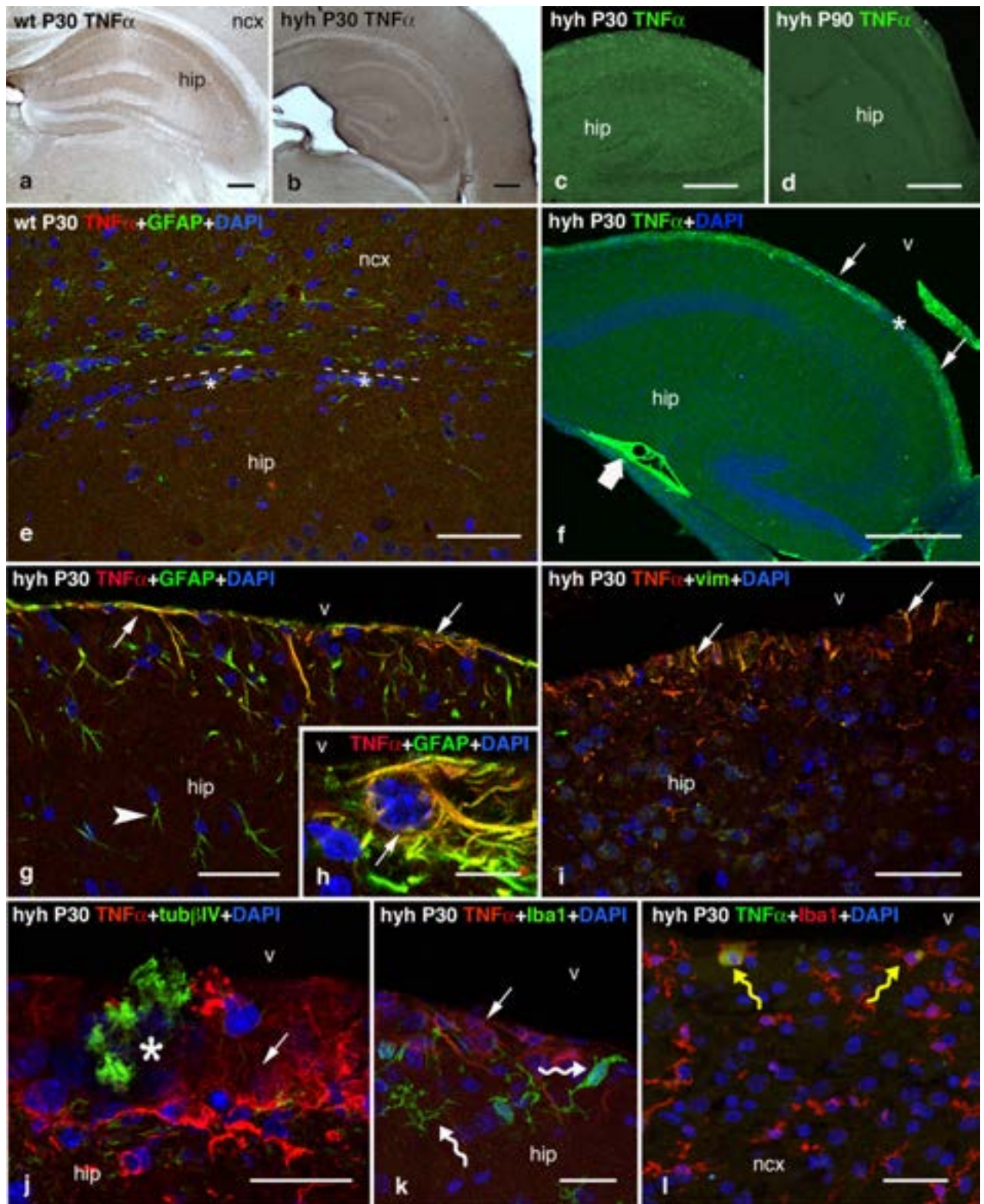


Figure 5. TNF α expression in the neocortex (ncx; **a, b, e, l**) and hippocampus (hip; **a–k**) of wt (**a, e**) and hyh (**b–d, f–i**) mutant mice at P30 (**b, c, f–l**) and P90 (**d**) with rat (**a, b, e, g–l**) and mouse (**c, d, f**) monoclonal antibodies against TNF α . (**a, b**) Immunoreactivity viewed under light microscopy. (**c, d**) Immunofluorescence (green) in the hippocampus. (**e**) Double immunofluorescence in neocortex and hippocampus with anti-TNF α (red) and anti-GEAP (green). The broken line denotes the lateral ventricle space between the neocortex and the hippocampus. (**f**) Immunofluorescence with anti-TNF α (green) in the hippocampus with DAPI (blue) counterstaining. Strong immunoreactivity was detected in the meninges (thick arrow). The ventricle surface covered by reactive astrocytes was also immunolabelled (arrows), but an ependymal patch was immunonegative (asterisk). (**g–i**) Double immunofluorescence against TNF α (red) and either GEAP (green, in **g** and **h**) or vimentin (vim; reactive astrocyte marker; green, in **i**) in the hippocampus. Reactive periventricular astrocytes (arrows, in **g–i**) are colabelled (orange/yellow) with both TNF α and GEAP or vimentin antibodies. Nonreactive astrocytes in the brain parenchyma (arrowhead, in **g**) were not colabelled (reaction in green). (**j–l**) Double immunofluorescence against TNF α (red, in **j** and **k**; green, in **l**) and tubulin- β IV (tub β IV, ependymal cilia marker; green, in **j**) or Iba1 (microglia marker; green, in **k**; red, in **l**) in the ventricle walls of the hippocampus (**j, k**) and neocortex (**l**). **j** represents a surface view from the ventricle of a thick frozen section displaying immunolabelling of cilia belonging to a small patch containing ependymal cells (asterisk) that resisted denudation. Microglial Iba1+ cells were not labelled with the TNF α antibody in the hippocampus (curved white arrows, in **k**), but some were found to be colabelled in the neocortical ventricle surface (curved yellow arrows, in **l**). The reactive astrocytes covering the ventricle surfaces displayed anti-TNF α immunoreactivity (arrows, in **j** and **k**). Abbreviations: hip, hippocampus; ncx, neocortex; v, ventricle lumen. Scale bars: **a, b**, 200 μ m; **c, d**, 100 μ m; **e, g, i**, 50 μ m; **f**, 250 μ m; **h**, 10 μ m; **j, k, l**, 25 μ m.

the denuded ependymal surfaces and the neighbouring brain parenchyma (Figure 6c–g). These cells were identified as astrocytes and microglia colabelled with GFAP and Iba1 (Figure 6h–k). In the Dandy-Walker case, which lacked ependymal denudation in the fourth ventricle, parenchymal astrocytes were also found to be immunopositive for TNF α (Figure 6b).

Significant differences in the levels of TNF α R1 mRNA expression between hyh and wt mice

The diffuse distribution of TNF α immunolabelling in the brain parenchyma and its absence from microglia suggested that this factor could be functioning via the TNF α R1 receptor. For this reason, the levels of TNF α R1 mRNA were quantified in the same animals following the same real-time PCR procedures as described for TNF α . A two-fold increase in the mean expression of TNF α R1 was detected in the hippocampus of hyh mice at P30 (Figure 3b) compared with wt mice. The TNF α R1 mRNA levels displayed the same trend as TNF α in the hyh mice at P90 and P180, although there was no significant difference detected compared with the wt mice (compare with Figure 3a). Furthermore, when the levels of TNF α mRNA and TNF α R1 mRNA were compared between each individual mouse at P30, P90 and P180, a significant high correlation probability (0.004) was found between them. Thus, the animals with higher TNF α mRNA levels also expressed higher levels of TNF α R1 mRNA.

TNF α R1 receptor expression in reactive astrocytes in hyh mice

The expression of TNF α R1 in the brain parenchyma was also studied in frozen sections with different antibodies. In

the wt and hyh mice these antibodies immunolabelled the cell bodies of astrocytes and their cell processes that contribute to the pia mater (Figure 7a,b), as well as the astrocyte perivascular endfeet near the meninges (Figure 7e,f). Similar to TNF α , and in agreement with the real-time PCR results, TNF α R1 immunoreactivity was stronger in the brain sections from hyh mice with severe hydrocephalus at P30 than in those from wt mice (not shown). In mature mice, TNF α R1 was found to be widely distributed throughout the brain parenchyma in a punctate pattern. In the hippocampus of wt and hyh mice, TNF α R1 immunoreactivity was primarily present in the layers occupied by interneurons and in the dendrites of the pyramidal (Figure 7g) and granular cells of the hippocampal CA1, CA2, CA3 areas and the dentate gyrus. Specifically in hyh mice, the antibodies also labelled the reactive astrocytes covering the ventricle surfaces of the neocortex (Figure 7c,d) and hippocampus (Figure 7i), as well as the cell bodies of neocortical neurons located in the oedema at the external capsule (Figure 7d). The TNF α R1 antibodies did not label the patches of ependymal cells that resisted denudation in hyh mice (Figure 7g,h).

Microglia in the brain cortex of hyh mice

In the present study, microglia were not detected as a primary source of TNF α expression in the hippocampus of hyh mice with congenital hydrocephalus. Because TNF α is a cytokine implicated in inflammatory responses, microglia at different stages of the development of hydrocephalus in hyh mice were examined. Phagocytic microglia/macrophages were only detected based on staining with tomato lectin and the Iba1 antibody at the

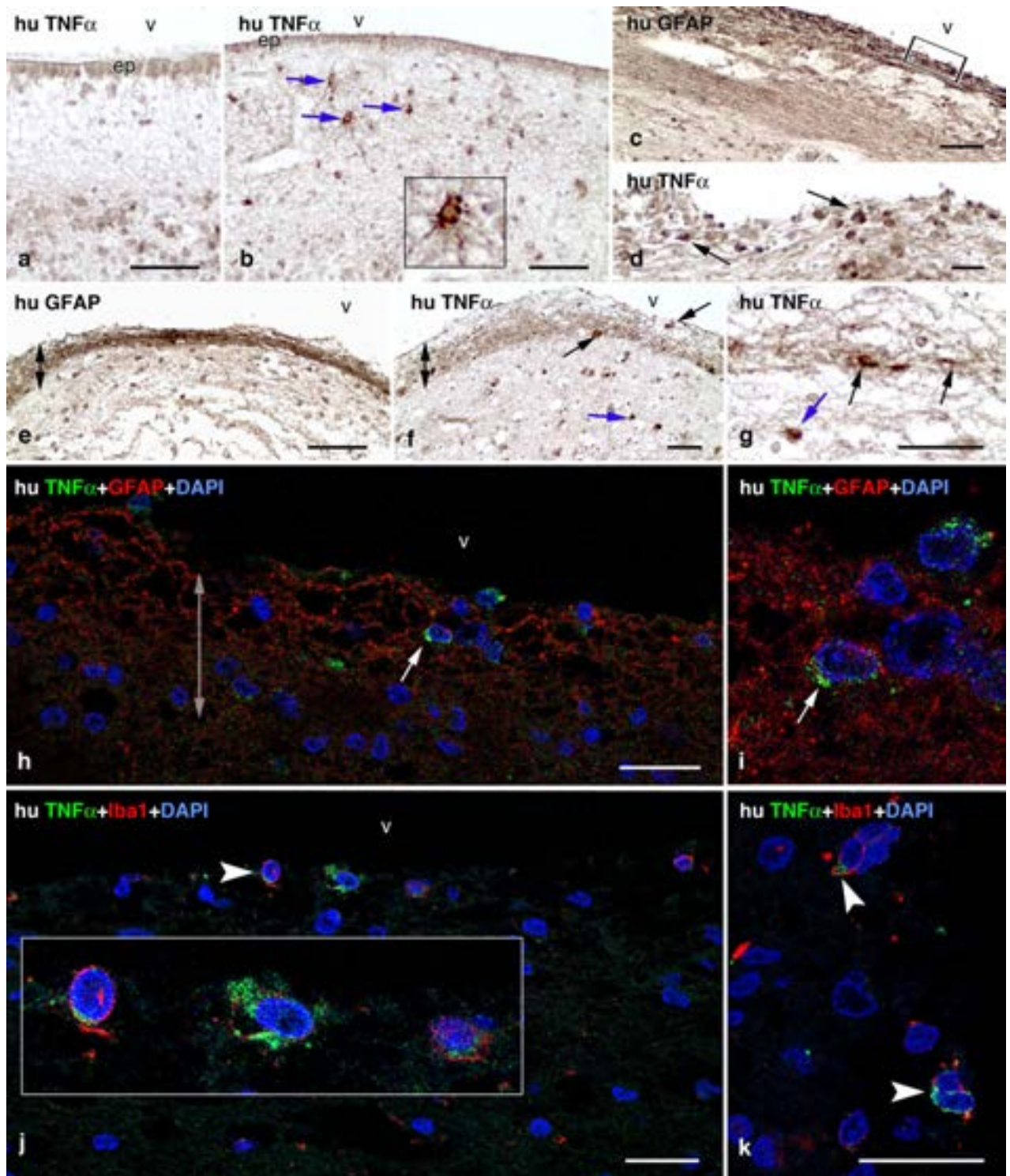


Figure 6. TNF α immunolabelling in the lateral (a, c–k) and fourth (b) ventricle walls of human fetuses (hu), including one control case with placental abruption at 29 weeks of gestation (a) and cases with primary forms of congenital hydrocephalus (b–k). Double-ended arrows denote the thickness of the astroglial periventricular reaction in denuded ependymal surfaces. (b) A Dandy-Walker case at 40 weeks of gestation displaying TNF α immunopositive astrocytes near the ventricular wall covered with ependyma. Insert shows magnified immunolabelling of a parenchymal astrocyte. (c, d) GFAP (c) and TNF α (d) immunostaining of a hydrocephalic foetus with cerebral polymalformation at 33 weeks of gestation. A consecutive section of the area framed in c is shown in magnification in d. TNF α immunoreactive cells were present among the reactive astrocytes (arrows). (e–k) Immunostaining against GFAP (e; h, i, reaction in red), Iba1 (j, k, reaction in red) and TNF α (f, g; h–k, reaction in green) in consecutive sections from a foetus with Potter syndrome type IIb and hydrocephalus at 40 weeks gestation. Cells were labelled with the TNF α antibody in the area of the astrocyte reaction at the ventricular surface (black arrows; in f and g). Other astrocytes deeper in the brain parenchyma were also labelled (blue arrows; in f and g). Some GFAP-positive reactive astrocytes (white arrows, in h and i) and Iba1-positive microglia (arrowheads, in j and k) also displayed TNF α immunoreactivity as shown in a 1- μ m confocal microscopy plane. Magnifications of the immunolabelled cells in h and j are shown in i and the Insert in j respectively. Scale bars: a, b, e, 50 μ m; c, 100 μ m; d, 25 μ m; f–k, 25 μ m.

early stages of hydrocephalus in *hyh* mice in the areas with periventricular oedema, such as the external capsule (Figure 8a,b). In contrast, phagocytic microglia were scarce in the hippocampus at this age and were not detectable in any part of the brain parenchyma in mature mice. Thus, in the hippocampus of *hyh* mice, Iba1+ microglia appeared similar to *wt* mice, displaying a morphology that did not resemble their phagocytic stage (Figure 8c–g). Only in the periventricular oedemas covering the alveus of the hippocampus and in the periventricular external capsule in the neocortex of *hyh* mice was it possible to detect the presence of any microglia extending thicker cell processes but lacking their classical activated morphology (Figure 8h). There were no significant differences in the mRNA levels of iNOS, a factor that can induce microglial activation, in the hippocampus between *wt* and *hyh* mice (Figure 8i), which is a factor that can be related to the activation of microglia. Nevertheless, some differences between the microglial populations of *wt* and *hyh* mice were revealed, indicating that microglia may be affected in some way. In *hyh* mice, there were not significantly higher numbers of Iba1+ cells in the hippocampus (Figure 8k), but some cells displayed a significantly stronger immunoreactivity to Iba1 antibodies (Figure 8i,j).

Discussion

In the present investigation, a significantly higher expression level of TNF α mRNA in the *hyh* animals with severe hydrocephalus was detected compared with *wt* mice and, interestingly, even compared with *hyh* mice exhibiting a compensated form of the disease. The qualitative observations obtained using TNF α antibodies to immunostain brain sections agreed well with the mRNA expression data. Two forms of immunoreactivity were detected using different TNF α antibodies: the labelling of individual cells,

including reactive astrocytes that replace the absent ependyma on most of the ventricular surfaces, and a diffuse pattern of labelling that was widely distributed throughout the brain parenchyma. The latter form of immunoreactivity suggests the existence of a soluble form of TNF α with a wide effect. Accordingly, the levels of TNF α R1 mRNA, which is the primary receptor for the soluble form of TNF α , were found to tightly correspond with the levels of TNF α in each individual animal. Results from P30 mice with severe hydrocephalus displayed a high degree of variance, ranging from TNF α mRNA levels similar to the control to eight-fold increases. However, neither the controls nor the older *hyh* mice exhibited such variance. According to Bátiz *et al.* [34], half of the P30 mice show macrocephaly, declining to only 6% after 90 days. Macrocephaly reversion was never observed in *hyh* mice. Only young mice lacking macrocephaly were able to survive and go on to develop compensated hydrocephalus. The frequency of marked macrocephaly and higher cerebrospinal fluid (CSF) pressure in P30 mice could explain the wide variations in TNF α expression, which were absent from all mice examined from P90 onwards.

The present results in *hyh* mice indicate that TNF α is associated with the pathophysiology of congenital hydrocephalus, likely through TNF α R1, and that TNF α may be related to the severity of the disease in some manner. Our results agree well with evidence obtained from other animal models. In an experimental model of obstructive hydrocephalus, involving intracisternal injection of kaolin in newborn rats, TNF α R1 receptor expression in the parietal cortex is upregulated and is associated with inflammatory responses [40]. In the H-Tx rat model, which develops congenital hydrocephalus, there is higher expression of ligands related to TNF α , indicating a role for TNF α in inflammatory responses, likely through microglial and astroglial reactions [41]. Such a function of

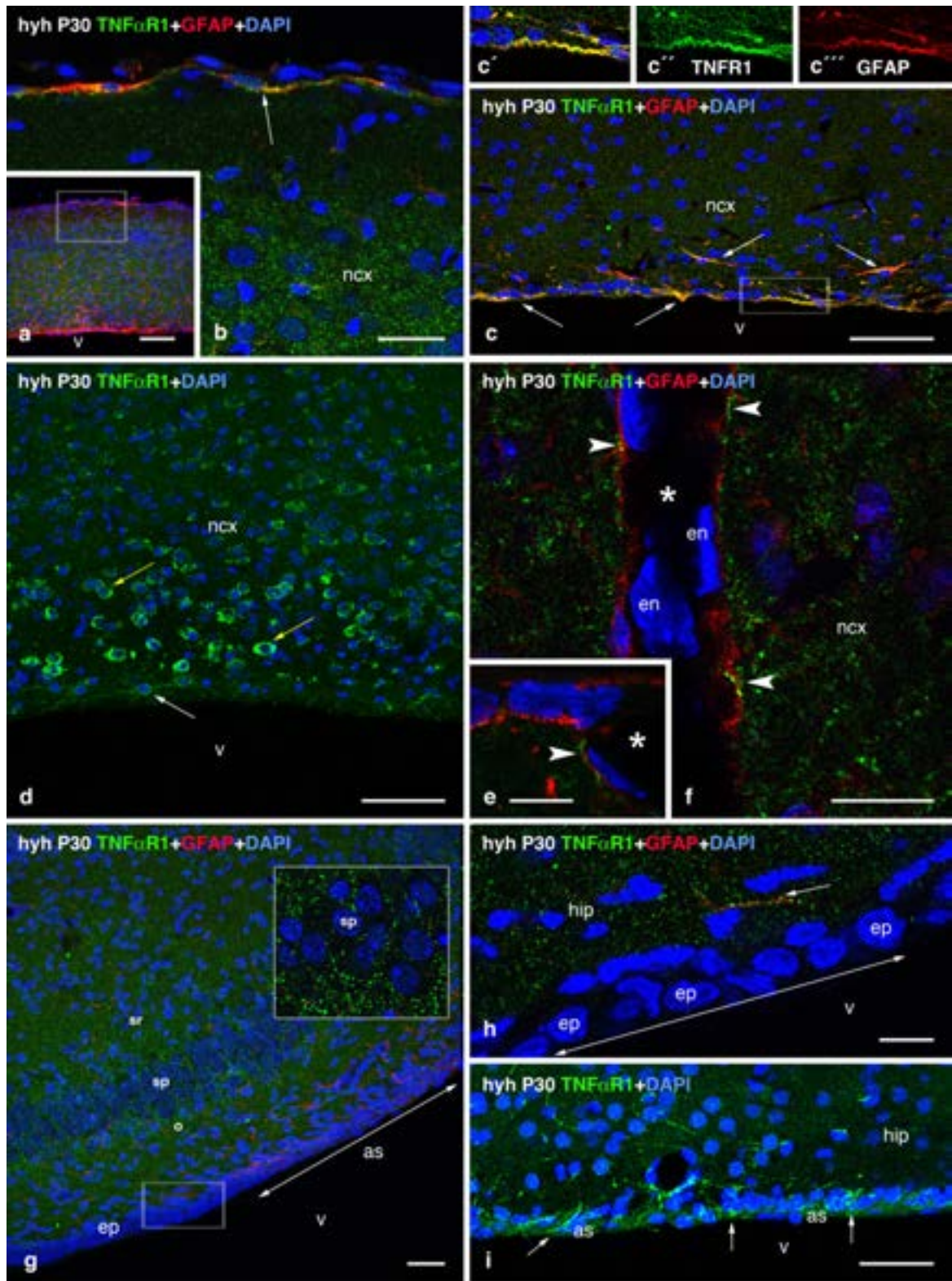


Figure 7. Immunofluorescence with a rabbit anti-TNF α R1 antibody (reaction in green) in the neocortex (a–f) and the hippocampus (g–i) of hyh (a–i) mice at P30. **a** Panoramic view of the neocortex. The area containing the meninges framed in **a** is shown in **b**. The GFAP+ astrocytes (reaction in red) that anchor the pia mater of the meninges (arrow, in **b**) expressed TNF α R1. Reactive astrocytes on the ventricle surface of the hippocampus and neocortex expressed the receptor (white arrows, in **c**, **d**, **h** and **i**; colabelled with GFAP, orange/yellow, in **c**). (**c'**) Magnification of the area containing reactive astrocytes framed in **b**. (**c''**, **c'''**). Separate channels corresponding to GFAP and TNF α R1 immunoreactivity. (**d**) Yellow arrows denote neocortical neurones immunoreactive against TNF α R1. The area of the neocortex in **d** displays a poorly developed periventricular astroglial reaction (see reference [38]) (**e**, **f**) Blood vessels near the meninges in 1- μ m-thick confocal planes. The processes of astrocytes and their perivascular endfeet (GFAP reaction in red; arrowheads; asterisk, vessel lumen) also displayed immunoreactivity to anti-TNF α R1 (reaction in green). (**g**, **h**) The ventricle surface of the hippocampus containing an ependymal patch neighbouring the periventricular astrocyte reaction. Insert in **g** represents a magnification of the stratum pyramidale as a 1- μ m confocal section. The ependyma-containing area framed in **g** is shown in **h** as a 1- μ m confocal plane. Abbreviations: as, reactive astrocyte; en, endothelial cell; ep, ependyma; hip, hippocampus; ncx, neocortex; o, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum, v, lateral ventricle lumen. Scale bars: **a**, **d**, **g**, **i**, 50 μ m; **b**, **c**, 25 μ m. **e**, **f**, **h** 7.5 μ m.

TNF α has also been revealed after the experimental therapeutic administration of Infliximab or mesenchymal stem cells in hydrocephalic animal models [42,43].

Inflammatory responses [44,45] and different neurodegenerative reactions have been described in the neocortex and hippocampus of animal models with hydrocephalus, including glial reactions [40,44], neuronal death and metabolic alterations [46–54], hypoxic conditions [55,56] and oxidative stress [56]. These responses have also been found to be involved in human foetal-neonatal hydrocephalus [57,58]. TNF α expression has been reported to be induced after ischaemic insults in brain tissue, including the hippocampus, and has been correlated with cell death [59–61]. In rats with hydrocephalus induced with kaolin, ischaemic conditions were reported in the brain cortex, including the hippocampus [62,63]. Ischaemic conditions would likely also be present in the hippocampus of hyh mice due to a high intraventricular pressure, and therefore, induction of TNF α upregulation would be plausible. Our observation of a more pronounced macrocephaly in the hyh mice at P30 (severe hydrocephalus) than at P90 (compensated hydrocephalus) suggests that intraventricular pressure may be higher in mice at P30 or during development and that pressure could induce a more pronounced cranial deformation. TNF α R1 has been primarily associated with programmed cell death and pro-inflammatory pathways that occur during brain injury [2]. We have also found that the receptor is widely distributed in the brain parenchyma; the presence of TNF α R1 in periventricular neocortical neurones suggests a likely role for TNF α in the degeneration of these neurones.

Reactive microglia and astrocytes are two cell populations involved in neurodegenerative and inflammatory processes and the production of TNF α . The H-Tx rat with congenital hydrocephalus exhibits a microglial response

that varies with age and hydrocephalus severity [64] and appears to be associated with higher CSF pressures [65]. In the case of the hyh mouse, ameboid stage microglia are only present in neocortical white matter during the first week of life ([33], present results), which is a period of time during which the periventricular white matter displays massive degeneration of myelin [33]. These cells cannot be detected later ([33], present results). Our present results concerning the microglial morphology and iNOS expression indicate that microglia would likely not be activated in mature hyh mouse. Although we did not detect a higher number of microglial cell bodies, some microglia expressed higher levels of Iba1, a macrophage/microglial-specific calcium-binding protein involved in Rac GTPase-dependent ruffling and phagocytosis [66]. Thus, these findings suggest that microglia could be alert or subtly activated in mature hyh mice.

In hyh mice with hydrocephalus, there is a particular periventricular astrocyte reaction that replaces the absence of ependyma in most of the ventricular system [33,38,39]. In the present study we found that astrocytes in those regions express both TNF α and the TNF α R1. Astrocytes have been shown to be able to produce TNF α and TNF α R1 *in vitro* to induce the autocrine production of nerve growth factor (NGF) and glial line-derived neurotrophic factor (GDNF) [67]. It has been found that injury or ischaemia in the central nervous system (CNS) of rats can lead to upregulation of the p75 receptor (TNF α FR2) for NGF in astrocytes, which likely controls astrocyte proliferation and, therefore, restricts the proper astrocyte response [68,69]. *In vitro* experiments have demonstrated the promotion and regulation of NGF by TNF α [24,70–72]. A defect in GDNF production by astrocytes has been suggested to mediate neuronal cell death in ischaemic conditions [73,74]. As another

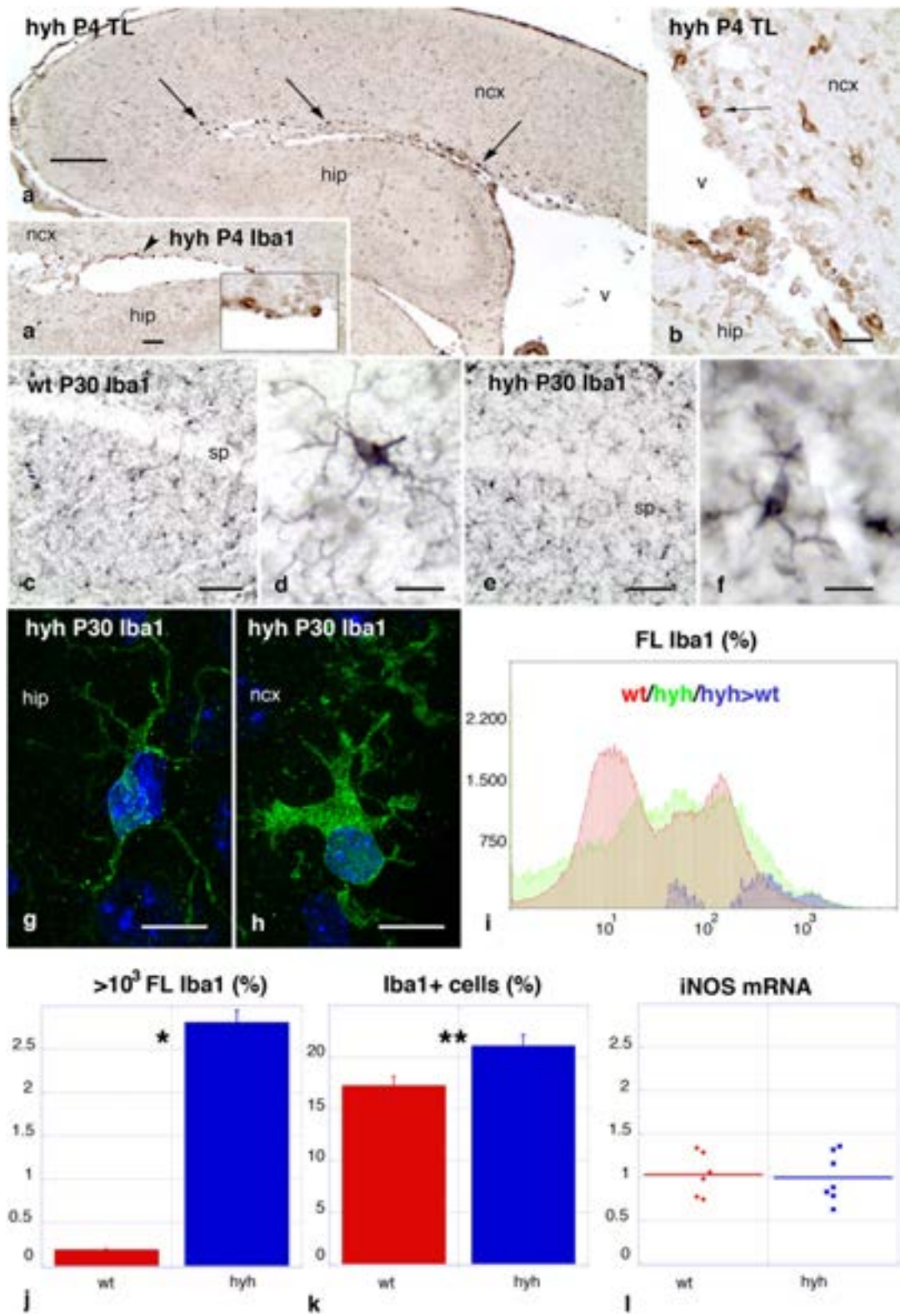


Figure 8. Stage of microglia in the hippocampus (hip) and neocortex (ncx) of wt and hyh mice. (a, b) Tomato lectin (TL) histochemistry in a hyh mouse at P4. Macrophagic cells are labelled (arrows, in a and b) in the periventricular oedematous area of the neocortex. (a') Adjacent section to that shown in a immunolabelled using the Iba1 antibody that also displaying the presence of macrophagic cells in the neocortex. The cells denoted with an arrowhead are magnified in the insert. (c-f) Iba1 immunolabelling of microglia in the hippocampus of wt (c, d) and hyh mice (e, f) at P30 using nickel intensification. (g, h) Iba1 immunolabelling of microglial cells in the hippocampus (g) and neocortex (h) of a hyh mouse at P30. Microglia with the morphology shown in h were found in the periventricular region of the neocortex but rarely in the hippocampus. (i-k) Flow cytometry analysis of Iba1 immunopositive cells in the hippocampus of wt and hyh mice at P30 ($n = 8$ mice per condition). (i) Representation of the number of events (Y axis) and Iba1 immunofluorescence intensity (FL, arbitrary units; X axis) for a wt mouse (red) and a hyh mouse (green). The area in blue represents the difference in the numbers of immunopositive events between the hyh mouse and the wt mouse. (j) Percentages of counts/total events with high Iba1 immunofluorescence intensity ($>10^3$ arbitrary units) in wt and hyh mice (* $P < 0.0001$; Student's t -test, unpaired data with unequal variance, F probability < 0.0005 ; bars represent SEM). (k) Number of Iba1+ events counted in the hippocampus of wt and hyh mice (** $P = 0.7$; Student's t -test, unpaired data with equal variance, F probability < 0.5 ; bars represent SEM). (l) mRNA levels of iNOS in the hippocampus of wt (red dots) and hyh (blue dots) mice at P30. The red and blue transversal lines represent the mean levels. Correlation analyses revealed that the differences were not significant between wt and hyh mice ($P = 0.9$; Student's t -test, unpaired data with equal variance, F probability < 0.8). Abbreviations: sp, stratum pyramidale; v, lateral ventricle lumen. Scale bars: a, 200 μm ; a', c, d, 50 μm ; b, 20 μm ; d, f, 10 μm ; g, h, 8 μm .

possible effect, the production of TNF α in astrocytes could mediate the permeability of the endothelium of the brain blood barrier. In fact, TNF α has been implicated in the opening of epithelial tight junctions under different pathological and inflammatory conditions [75–80]. The presence of the TNF α R2 receptor has been reported in endothelial cells [60], where it could play a role in the regulation of vascular permeability. We detected the presence of TNF α and its TNF α R1 receptor in the perivascular endfeet of nonreactive astrocytes and in the meninges of the hyh mice, suggesting that TNF α could also perform some unknown functions, including a role in vascular permeability or an effect on the blood-brain barrier.

In the present investigation, we detected TNF α in periventricular reactive astrocytes and microglia in necropsies of a small number of human foetuses with different forms of primary hydrocephalus. Thus, it could be suggested that TNF α is also associated with human primary hydrocephalus via glial reactions. In contrast to hyh mice, the number of TNF α -expressing astrocytes appeared to be low. This could be due to the difficulty in achieving satisfactory fixation of human tissue. Previous reports regarding the role of TNF α in different forms of human hydrocephalus are limited and contradictory. Moreover, those studies examined a different form of hydrocephalus than those examined in the present investigation. For example, Tarkowski *et al.* [81] described high levels of TNF α in their study carried out in adult patients exhibiting normal pressure hydrocephalus with different causes, and they suggested that TNF α could be a possible biomarker of the disease. However, Leinonen *et al.* [82] reported low levels of TNF α in idiopathic cases of normal pressure hydrocephalus in elderly patients.

TGF β 1 has been described as playing a role in the pathogenesis of posthaemorrhagic and communicant hydrocephalus [83–91]. TGF β 1 has a fibrogenic effect that induces scar formation around blood vessels, in the glia limitans, and in the subarachnoid space, thus contributing to the impairment of CSF absorption and to the perivascular drainage of interstitial fluid, reducing cerebral compliance [92]. TGF β 1 controls glial reactions by inhibiting microglial and astroglial proliferation [26,93–95]. TGF β 1 has been implicated in the regulation of GFAP expression in reactive astrocytes present in neurodegenerative diseases and experimental injuries [96–99]. Upregulation of GFAP has been detected in the present study in both the severe and compensated forms of hydrocephalus in hyh mice. However, TGF β 1 levels in hyh mice were not significantly different compared with those in wt mice and were also not significantly different between the severe and compensated disease forms. Thus, it can be suggested that TGF β likely does not play a key role in the late development of congenital hydrocephalus in hyh mice. Nevertheless, despite the results stated above, the effects of TGF β 1 on the generation of the astrocytic response cannot be discounted during the initial stages of the disease. Thus, it is possible that the levels of TGF β 1 increased during the early stages of hydrocephalus, after which they could decrease.

In conclusion, TNF α and TNF α R1 were found to be upregulated in hyh mice with the severe form of hydrocephalus and may therefore be associated with disease pathogenesis or progression. Our findings also suggest that TNF α may be considered as a possible biomarker for disease prognosis. Understanding the role that TNF α plays in hydrocephalus could potentially facilitate the development of novel disease treatments.

Acknowledgements

The authors wish to thank David Navas from the University of Malaga (Spain) for his valuable technical support and the staff of the Animal Experimentation Service of the University of Malaga for their support during the experiments. The present work was supported by the grants PS09/0376 and PI12/0631 to A-JJ; SERAM to M-IM-L; PI12/01431 to AG; and PI12/01437 to JV.

Author contributions

A-JJ, J-MP-F and AG prepared the manuscript; A-JJ, BR, M-AA, AG, JV and J-MP-F designed the experiments and analysed the results; A-JJ, M-DD-P, MC, M-IM-L, M-LG-M performed MR experiments; A-JJ, LMRP, RRB, SJ, AG and JV performed real-time PCR experiments; A-JJ, L-MR-P and M-CG-R performed flow cytometry analyses; A-JJ, L-MR-P, M-DD-P, M-CG-R, MG-B, AH-P, M-CR-M performed immunocytochemical experiments.

References

- MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; **14**: 477–92
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; **214**: 149–60
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2001; **49**: 1215–28
- Ghosh S. Biologic therapies: lessons from multiple sclerosis. *Dig Dis* 2012; **30**: 383–6
- Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989; **170**: 607–12
- McGuire C, Beyaert R, van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci* 2012; **34**: 619–28
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991; **129**: 318–20
- Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- α and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; **7**: 42–59
- Morales I, Farías G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 2010; **17**: 202–4
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegl M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990; **63**: 251–8
- Kriegl M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A Novel Form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; **53**: 45–53
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; **24**: 1297–305
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; **83**: 793–802
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; **117**: 244–79
- Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, Pfizenmaier K, Eisel U, Pitossi F. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* 2011; **227**: 237–51
- Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE* 2011; **6**: e27621
- Deng YY, Lu J, Ling EA, Kaur C. Microglia-derived macrophage colony stimulating factor promotes generation of proinflammatory cytokines by astrocytes in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain. *Brain Pathol* 2010; **20**: 909–25
- McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 2008; **5**: 45
- Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 1997; **150**: 1473–86
- Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor- α mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* 2010; **22**: 977–83
- Rathnasamy G, Ling EA, Kaur C. Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligodendrocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species. *J Neurosci* 2011; **31**: 17982–95
- Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 2009; **80**: 224–32

- 23 Wang MJ, Huang HJ, Chen WF, Chang HF, Kuo JS. Glycogen synthase kinase-3 β inactivation inhibits tumor necrosis factor- α production in microglia by modulating nuclear factor κ B and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation* 2010; **7**: 99
- 24 Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; **144**: 129–35
- 25 Tzeng SF, Kahn M, Liva S, De Vellis J. Tumor necrosis factor-alpha regulation of the Id gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. *Glia* 1999; **26**: 139–52
- 26 Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, Bohatschek M, Hristova M, Friedrichsen S, Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G. Endogenous transforming growth factor β 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. *J Neurosci* 2007; **27**: 11201–13
- 27 Abe K, Chu PJ, Ishihara A, Saito H. Transforming growth factor- β 1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; **723**: 206–9
- 28 Henrich-Noack P, Prehn JH, Kriegstein J. TGF- β 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke* 1996; **27**: 1609–14
- 29 Lehrmann E, Kiefer R, Finsen B, Diemer NH, Zimmer J, Hartung HP. Cytokines in cerebral ischemia: expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 1995; **131**: 114–23
- 30 Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B. Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor- β 1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 1998; **24**: 437–48
- 31 Bronson RT, Lane PW. Hydrocephalus with hop gait (hyh): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; **54**: 131–6
- 32 Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebregt P, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 1105–19
- 33 Páez P, Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Rodríguez S, Jiménez AJ, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; **66**: 1082–92
- 34 Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, Rodríguez S, Wagner C, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM. Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the hyh mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 2006; **1**: 152–68
- 35 Bátiz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Matas IM, Páez P, Roque M, Jiménez AJ, Ramos C, Pérez-Figares JM. A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 2009; **23**: 281–90
- 36 Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 1033–41
- 37 Wagner C, Bátiz LF, Rodríguez S, Jiménez AJ, Páez P, Tomé M, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM. Mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 1019–40
- 38 Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vío K, Ho-Plagaro A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez LM, Domínguez-Pinos MD, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM, Jiménez AJ. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 2012; **124**: 531–46
- 39 Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA, Bátiz LF, Rodríguez-Pérez LM, Páez P, Soriano-Navarro M, Roales-Buján R, Rivera P, Rodríguez S, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; **68**: 1006–20
- 40 Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW, McAllister JP 2nd. Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 2010; **226**: 110–19
- 41 Miller JM, Kumar R, McAllister JP 2nd, Krause GS. Gene expression analysis of the development of congenital hydrocephalus in the H-Tx rat. *Brain Res* 2006; **1075**: 36–47
- 42 Kurt G, Cemil B, Borcek AO, Borcek P, Akyrek N, Sepici A, Ceviker N. Infliximab administration reduces neuronal apoptosis on the optic pathways in a rabbit hydrocephalus model: a preliminary report. *Br J Neurosurg* 2010; **24**: 275–9
- 43 Ahn SY, Chang YS, Sung DK, Sung SI, Yoo HS, Lee JH, Oh WI, Park WS. Mesenchymal stem cells prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage. *Stroke* 2013; **44**: 497–504
- 44 Xu H, Zhang SL, Tan GW, Zhu HW, Huang CQ, Zhang FF, Wang ZX. Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience* 2012; **218**: 317–25
- 45 Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Analysis of age-dependant alteration in the brain gene expression profile following induction of hydrocephalus in rats. *Exp Neurol* 2002; **173**: 105–13

- 46 Del Bigio MR, Bruni JE. Silicone oil-induced hydrocephalus in the rabbit. *Childs Nerv Syst* 1991; **2**: 79–84
- 47 Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 2003; **53**: 337–46
- 48 Ding Y, McAllister JP 2nd, Yao B, Yan N, Canady AI. Axonal damage associated with enlargement of ventricles during hydrocephalus: a silver impregnation study. *Neurol Res* 2001; **23**: 581–7
- 49 Ding Y, McAllister JP 2nd, Yao B, Yan N, Canady AI. Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience* 2001; **106**: 659–67
- 50 Egawa T, Mishima K, Egashira N, Fukuzawa M, Abe K, Yae T, Iwasaki K, Fujiwara M. Impairment of spatial memory in kaolin-induced hydrocephalic rats is associated with changes in the hippocampal cholinergic and noradrenergic contents. *Behav Brain Res* 2002; **129**: 31–9
- 51 Kawamata T, Katayama Y, Tsuji N, Nishimoto H. Metabolic derangements in interstitial brain edema with preserved blood flow: selective vulnerability of the hippocampal CA3 region in rat hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 2003; **86**: 545–7
- 52 Klinge P, Mühlendyck A, Lee S, Lüdemann W, Groos S, Samii M, Brinker T. Temporal and regional profile of neuronal and glial cellular injury after induction of kaolin hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* 2002; **81**: 275–7
- 53 Kondziella D, Eyjolfsson EM, Saether O, Sonnewald U, Risa O. Gray matter metabolism in acute and chronic hydrocephalus. *Neuroscience* 2009; **159**: 570–7
- 54 Shim I, Ha Y, Chung JY, Lee HJ, Yang KH, Chang JW. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurgery* 2003; **53**: 416–25
- 55 Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, Leichter A, Leibson Z, Luciano MG. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus. *Neuroscience* 2008; **152**: 346–59
- 56 Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Exp Neurol* 1999; **155**: 109–17
- 57 Castejón OJ. Submicroscopic pathology of human and experimental hydrocephalic cerebral cortex. *Folia Neuropathol* 2010; **48**: 159–74
- 58 Sival DA, Felderhoff-Müser U, Schmitz T, Hoving EW, Schaller C, Heep A. Neonatal high pressure hydrocephalus is associated with elevation of pro-inflammatory cytokines IL-18 and IFN γ in cerebrospinal fluid. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008; **5**: 21
- 59 Botchkina GI, Meistrell ME 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 1997; **11**: 765–81
- 60 Maddahi A, Kruse LS, Chen QW, Edvinsson L. The role of tumor necrosis factor- α and TNF- α receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation* 2011; **8**: 107
- 61 Watters O, O'Connor JJ. A role for tumor necrosis factor- α in ischemia and ischemic preconditioning. *J Neuroinflammation* 2011; **8**: 87
- 62 Del Bigio MR. Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 946–54
- 63 Klinge PM, Samii A, Mühlendyck A, Visnyei K, Meyer GJ, Walter GF, Silverberg GD, Brinker T. Cerebral hypoperfusion and delayed hippocampal response after induction of adult kaolin hydrocephalus. *Stroke* 2003; **34**: 193–9
- 64 Mangano FT, McAllister JP 2nd, Jones HC, Johnson MJ, Kriebel RM. The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res* 1998; **20**: 697–704
- 65 Miller JM, McAllister JP 2nd. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2007; **4**: 5
- 66 Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 2000; **113**: 3073–84
- 67 Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, Nabeshima T, Wang J, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res* 2006; **1116**: 12–18
- 68 Cragolini AB, Volosin M, Huang Y, Friedman WJ. Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Dev Neurobiol* 2012; **72**: 766–76
- 69 Oderfeld-Nowak B, Orzyłowska-Sliwińska O, Soltys Z, Zaremba M, Januszewski S, Janeczko K, Mossakowski M. Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience* 2003; **120**: 31–40
- 70 Ait-Ikhlef A, Hantaz-Ambroise D, Jacque C, Belkadi L, Rieger F. Astrocyte proliferation induced by wobbler astrocyte conditioned medium is blocked by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1beta (IL-1beta) neutralizing antibodies in vitro. *Cell Mol Biol* 1999; **4**: 393–400
- 71 Cui M, Huang Y, Tian C, Zhao Y, Zheng J. FOXO3 inhibits TNF- α and IL-1 β -induced astrocyte proliferation: implication for reactive astrogliosis. *Glia* 2011; **59**: 641–54
- 72 Faber-Elman A, Lavie V, Schwartz I, Shaltiel S, Schwartz M. Vitronectin overrides a negative effect of TNF-alpha on astrocyte migration. *FASEB J* 1995; **9**: 1605–13

- 73 Yamagata K, Tagami M, Ikeda K, Tsumagari S, Yamori Y, Nara Y. Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression during hypoxia and reoxygenation in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Glia* 2002; **37**: 1–7
- 74 Yamagata K. Pathological alterations of astrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats under ischemic conditions. *Neurochem Int* 2012; **60**: 91–8
- 75 Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1 β by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- α effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 2003; **86**: 246–54
- 76 Kimura K, Teranishi S, Fukuda K, Kawamoto K, Nishida T. Delayed disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells induced by tumor necrosis factor- α in a manner dependent on NF- κ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 565–71
- 77 Landoni VI, Schierloh P, de Campos Nebel M, Fernández GC, Calatayud C, Laponi MJ, Isturiz MA. Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002632
- 78 Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; **9**: 540–9
- 79 Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann NY Acad Sci* 2012; **1258**: 9–18
- 80 Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G496–504
- 81 Tarkowski E, Tullberg M, Fredman P, Wikkelsö C. Normal pressure hydrocephalus triggers intrathecal production of TNF-alpha. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 707–14
- 82 Leinonen V, Menon LG, Carroll RS, Dello Iacono D, Grevet J, Jääskeläinen JE, Black PM. Cerebrospinal fluid biomarkers in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Int J Alzheimers Dis* 2011; **2011**: 312526
- 83 Cherian S, Thoresen M, Silver IA, Whitelaw A, Love S. Transforming growth factor-betas in a rat model of neonatal posthaemorrhagic hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; **30**: 585–600
- 84 Douglas MR, Daniel M, Lagord C, Akinwunmi J, Jackowski A, Cooper C, Berry M, Logan A. High CSF transforming growth factor β levels after subarachnoid haemorrhage: association with chronic communicating hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; **80**: 545–51
- 85 Flood C, Akinwunmi J, Lagord C, Daniel M, Berry M, Jackowski A, Logan A. Transforming growth factor- β 1 in the cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage: titers derived from exogenous and endogenous sources. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 157–62
- 86 Galbreath E, Kim SJ, Park K, Brenner M, Messing A. Overexpression of TGF- β 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 339–49
- 87 Heep A, Stoffel-Wagner B, Bartmann P, Benseler S, Schaller C, Groneck P, Obladen M, Felderhoff-Mueser U. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 are highly expressed in cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Pediatr Res* 2004; **56**: 768–74
- 88 Kanaji M, Tada T, Kobayashi S. A murine model of communicating hydrocephalus: role of TGF- β 1. *J Clin Neurosci* 1997; **4**: 51–6
- 89 Kitazawa K, Tada T. Elevation of transforming growth factor-beta 1 level in cerebrospinal fluid of patients with communicating hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1994; **25**: 1400–4
- 90 Whitelaw A, Christie S, Pople I. Transforming growth factor- β 1: a possible signal molecule for posthemorrhagic hydrocephalus? *Pediatr Res* 1999; **46**: 576–80
- 91 Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM, Mucke L. Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- β 1. *Am J Pathol* 1995; **147**: 53–67
- 92 Johanson CE, Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A, Baird A, McMillan P, Stopa EG. Altered formation and bulk absorption of cerebrospinal fluid in FGF-2-induced hydrocephalus. *Am J Physiol* 1999; **277**: R263–71
- 93 Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G. Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res* 1998; **795**: 301–6
- 94 Lindholm D, Castrén E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor- β 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992; **117**: 395–400
- 95 Vergeli M, Mazzanti B, Ballerini C, Gran B, Amaducci L, Massacesi L. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J Neurosci Res* 1995; **40**: 127–33
- 96 Krohn K, Rozovsky I, Wals P, Teter B, Anderson CP, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor- β 1 and interleukin-1 β are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem* 1999; **72**: 1353–61
- 97 Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 355–63

- 98 Romão LF, Sousa V de O, Neto VM, Gomes FC. Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF- β 1 pathways. *J Neurochem* 2008; **106**: 746–56
- 99 Sousa V de O, Romao L, Neto VM, Gomes FC. Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from

distinct brain regions. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 1721–30

Received 17 July 2013

Accepted after revision 20 December 2013

Published online Article Accepted on 26 December 2013

Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption

Antonio J Jiménez^{1*}, María-Dolores Domínguez-Pinos¹, María M Guerra², Pedro Fernández-Llebrez¹ and José-Manuel Pérez-Fígares¹

¹Department of Cell Biology, Genetics, and Physiology; University of Malaga; Malaga, Spain; ²Institute of Anatomy, Histology, and Pathology; Austral University of Chile; Valdivia, Chile

Keywords: Ependyma, hydrocephalus, neural tube defects, cell junctions, cilia, development, aquaporin 4, astrocyte reaction.

The neuroepithelium is a germinal epithelium containing progenitor cells that produce almost all of the central nervous system cells, including the ependyma. The neuroepithelium and ependyma constitute barriers containing polarized cells covering the embryonic or mature brain ventricles, respectively; therefore, they separate the cerebrospinal fluid that fills cavities from the developing or mature brain parenchyma. As barriers, the neuroepithelium and ependyma play key roles in the central nervous system development processes and physiology. These roles depend on mechanisms related to cell polarity, sensory primary cilia, motile cilia, tight junctions, adherens junctions and gap junctions, machinery for endocytosis and molecule secretion, and water channels. Here, the role of both barriers related to the development of diseases, such as neural tube defects, ciliary dyskinesia, and hydrocephalus, is reviewed.

Purpose of the Review

The ependyma constitute a ciliated epithelium that derives from the neuroepithelium during development and is located at the interface between the brain parenchyma and ventricles in the central nervous system (CNS). After neurulation, the neural plate forms the neural tube, which undergoes stereotypical constrictions by bending and expanding to form the embryonic vesicles, and becomes the forebrain, midbrain, and hindbrain. Therefore, the original cavity of the neural tube forms the embryonic ventricles, constituting a series of connected cavities lying deep in the brain that are filled with cerebrospinal fluid (CSF).¹ Later during development, the forebrain ventricle develops massive expansion and splitting to form the lateral and third ventricles. In the

midbrain, the ventricle remains as a narrow aqueduct connecting the third and fourth ventricles, with the latter located in the hindbrain. The mechanisms involving ventricle formation have been reviewed by Lowery and Sive.¹ The neuroepithelium and ependyma constitute barriers lining a ventricular lumen in the developing and mature CNS, respectively, and perform important functions related to the development, morphogenesis, and physiology of the brain. Detailed reviews exist in the literature regarding the ependyma.²⁻⁷ This review is focused on the role of the neuroepithelium/ependyma on the origin and etiology of hydrocephalus and other related pathologies.

Hydrocephalus is not a single disease but a pathophysiological condition of CSF dynamics comprising fetal- and adult-onset forms.⁸ Hydrocephalus has been considered a CNS condition consisting of a net accumulation of intraventricular or extraventricular CSF independent of hydrostatic or barometric pressure. The increase in CSF volume causes an enlargement of the ventricular cavities, i.e., ventriculomegaly.⁹ Regarding the circulation of CSF, different forms of hydrocephalus have been grouped as non-communicating or communicating.¹⁰ The former entails forms presenting an obstruction in the intracerebroventricular CSF circulation, mainly in the aqueduct. In the case of the communicating hydrocephalus CSF circulates between the ventricles, but CSF absorption in some cases could be impaired by structural blockage or reduced physiological transport at the arachnoid membrane and its granulations, cranial nerve lymphatics, and capillaries and microvessels.¹¹ In addition, there is not always a very high intraventricular pressure associated with hydrocephalus, as is the case of the so-called normal pressure hydrocephalus. It is estimated that a very small increase in the gradient of pressure between the ventricle and the subarachnoid space is sufficient to produce ventricular dilatation, which would occur at the expense of the brain's interstitial fluid.^{12,13} Recently, a unifying classification has been proposed considering hydrocephalus with multiple points of intraventricular and extraventricular CSF circulation obstruction, resulting in CSF accumulation.¹⁴ The hydrocephalus origin can be congenital or acquired. Genetic factors are involved in congenital hydrocephalus formation, but other factors underlie its development, such as congenital malformations, intracerebral hemorrhages, maternal alcohol abuse, infection, and X-radiation during pregnancy.¹⁵ Alterations in the

*Correspondence to: Antonio J Jiménez, Email: ajjimenez@uma.es

Submitted: 12/18/13; Revised: 03/03/14; Accepted: 03/03/14;

Published Online: 03/19/14

Citation: Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2014; 2:e28426; <http://dx.doi.org/10.4161/tisb.28426>

ependyma that are present in some cases of hydrocephalus, consisting on in its flattening or loss, have been considered to be a consequence of the high intracerebroventricular pressure and ventricle surface stretching, tissue compression, cerebral ischemia and hypoxia and neuroinflammation.^{2,5} In cases of adult-onset normal pressure hydrocephalus there is not detailed information on how the ependyma reacts. In this review it will be argued that the disruption of the ependyma could be due to problems in the neuroepithelium development in cases of fetal-onset hydrocephalus. However, the possibility of secondary changes due ventricle enlargement and tissue compression, cerebral ischemia and hypoxia, and neuroinflammation cannot be discarded.

Cilia-related diseases that are associated with hydrocephalus are considered consequences of defects in neuroepithelium/ependyma development and are related to primary cilia or motile water-propelling cilia functions. Cilia-related diseases include ciliary dyskinesia and situs inversus.¹⁶ Hydrocephalus can also involve problems in neurogenesis or corticogenesis, most likely sharing the same cellular origin.¹⁷

The Role of the Neuroepithelium in CNS Development

During CNS development the germinal zone is constituted by a pseudostratified neuroepithelium. Radial glial cells originate in the neuroepithelium; these cells are neural multipotent stem cells that also guide migrating neurons, thus determining the neuronal fate and position in the developing brain.¹⁸ Therefore, the neuroepithelium performs neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface.¹⁹ Radial glial cells display an apical-basal polarization, and they stretch from the luminal surface to the basement membrane at the pial surface (Fig. 1A). They are joined with tight junctions apically (zonula occludens) and with adherens (zonula adherens) junctions and gap junctions in their lateral plasma membrane domains.^{19,20} The existence of an apical-basal polarity in the progenitors in the ventricular zone suggests that they receive extrinsic growth factor from the CSF, likely via their sensory apical primary cilium.¹⁹

In addition to the aforementioned germinal function, the neuroepithelium is involved in normal brain morphogenesis, performing a temporal occlusion of the neural tube at a moment when the posterior neuropore is still open and the anterior pore is already closed, thus allowing for the expansion of the cranial ventricular system and brain growth.²¹ This expansion is induced by an increase in intraventricular pressure at a moment when the choroid plexuses are not developed; therefore, they do not yet produce CSF. The neuroepithelium has been suggested as the source of the particular chemical composition of embryonic intraventricular CSF. The cellular mechanism underlying such expansion in chick embryos has been reported to require calmodulin. This mechanism is dependent on extracellular Ca^{2+} , mediated by cAMP and may involve N-cadherin.²² Recent studies in zebrafish development have shed further light regarding the role of neuroepithelial cells in this mechanism. Neuroepithelial tight junctions containing claudin5a create an

early cerebral-ventricular barrier, thus allowing for ventricular lumen expansion driven by hydrostatic pressure.²³ However, the neuroepithelium actively transports Na^+ and secretes proteins and proteoglycans into the ventricle, contributing to an increase in the intraventricular hydrostatic pressure.²¹ Furthermore, neuroepithelial relaxation allows for lumen expansion through the regulation of myosin contractibility.²⁴ Zebrafish mutant analyses indicate that the heartbeat and blood circulation also contributes to ventricle expansion.²⁵ Additionally, the pressure created in the ventricle appears to play another important role in stimulating progenitor cell proliferation and brain morphogenesis.²¹ This stimulation explains the higher rate of ependymal cell production occurring in several ventricles during the ventriculomegaly process in congenital hydrocephalus, which has been described in the *hyh* mouse model.²⁶

In the immature brain, the neuroepithelial cells present in their apical poles the so-called strap junctions, which have been considered different from tight junctions. These junctions would form a physical barrier restricting the movement of molecules such as proteins.²⁷⁻²⁹ These strap junctions might restrict the entry of protein from CSF, which present very high concentration in the early brain development, into brain interstitial fluid. The existence of embryonic CSF with a certain chemical composition supports morphogenetic processes and regionalization in the neural tube during development, playing a key role in promoting the survival and proliferation of neuroepithelial cells.³⁰ Problems in the composition and circulation of the CSF have been hypothesized to underlie abnormal corticogenesis in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus.^{31,32} Lehtinen et al. recently reviewed the role of embryonic CSF in neurogenesis through growth- and survival-promoting factors, such as insulin and insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2, fibroblast growth factor 2 (FGF2), sonic hedgehog, and retinoic acid.¹⁹

In addition to the role of the neuroepithelium derived from the presence of stem cells in several regions, in some locations the cells become specialized in secreting molecules and morphogens that govern CNS development.⁴ Thus, the dorsal and ventral lines of the roof and floor plates contain specialized epithelial cells that act as organizers guiding neuronal development, providing morphogens and signals, such as Netrin-1, SLIT, Sonic Hedgehog, and members of the TGF β superfamily.³³ The ultrastructural analysis of the midbrain floor plate has revealed the presence of secretory cell machinery most likely involved in the secretion of molecules toward the ventricle CSF; the functions of these molecules remain unclear.³⁴⁻³⁶

Finally, during development, a subpopulation of radial glial cells produces the ependymal cells, which will become differentiated cells that are unable to proliferate under normal conditions.³⁷ In mice and humans, the differentiation process of the ependymal cells follows a precise temporospatial pattern throughout the ventricular system, which has been extensively reported and reviewed by Bruni et al., Bruni, and Sarnat.^{2,4,5,38} The homeobox gene *Six3* controls the late maturation of the ependyma during late development, which suppresses radial glial cell properties.³⁹

In the lateral ventricles of mature animals and humans, stem cells derived from the neuroepithelium are retained between the

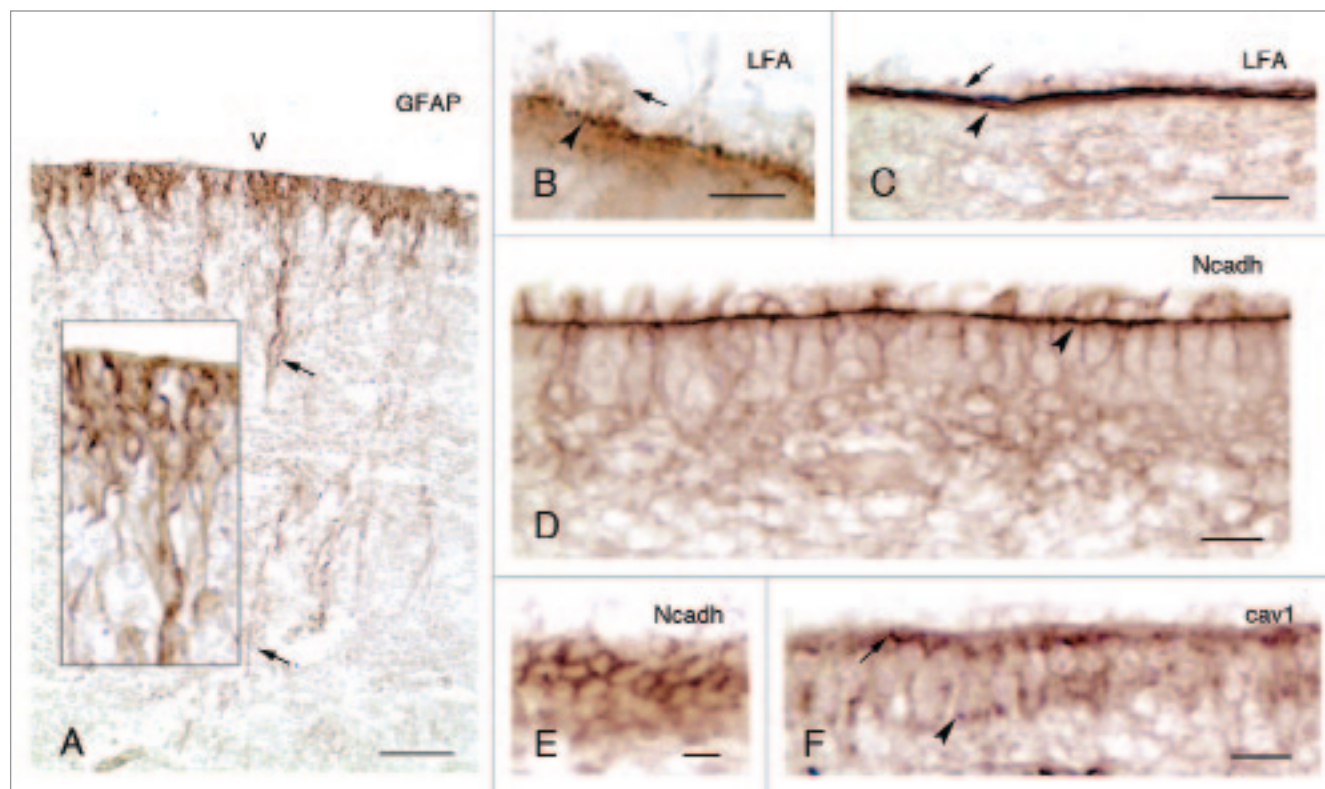
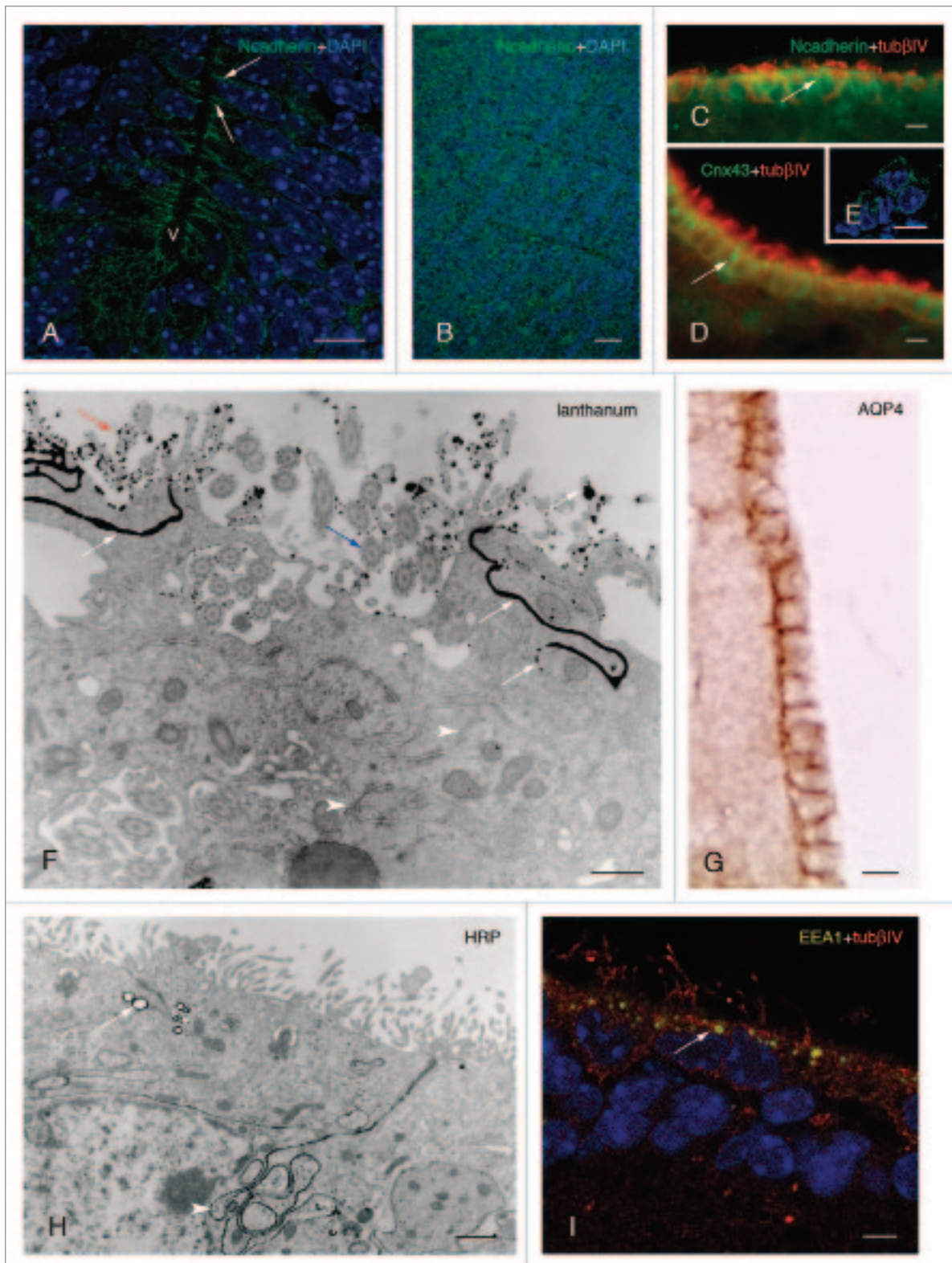


Figure 1. Development and properties of the multiciliated ependyma in the lateral ventricle of human fetuses. **(A, insert)** In a fetus at 23 wk of gestation, radial glial cells are observed that display long basal processes (arrows) and express GFAP. **(B and C)** In fetuses at 25 and 36 wk of gestation, multiciliated ependymal cells are already appreciated (arrows point to cilia) and present sialic acid at their apical pole (arrowheads), which is detected with an antibody against the *Limax flavus* agglutinin (LFA). **(D-F)** Mature multiciliated ependymal cells in a fetus at 30 wk of gestation. N-cadherin (Ncadh) is observed in transversal **(D)** and tangential sections **(E)** arranged in cell junctions (arrowhead in D). **(F)** Caveolin (cav1) is present in the apical pole (arrow) and basal processes (arrowhead) of mature multiciliated ependymal cells in a fetus at 30 wk of gestation. Abbreviations, v, ventricle lumen. Bars: A, 50 μ m; B, 5 μ m; C, E, F, 10 μ m; D, 20 μ m.

ependymal cells, constituting a neurogenic niche in the subventricular zone.^{40,41} In addition to supporting stem cells, ependymal cells also promote neurogenesis in the niches secreting Noggin, a bone morphogenetic protein (BMP) antagonist.⁴² In adult rats, the induced disruption of the mature multiciliated ependyma of the lateral ventricles with subventricular zone niches affects neurogenic and gliogenic activity.⁴³ The mature ependyma presents limited repair in the lateral ventricles arising from stem cell niches in the subventricular zone.^{44,45} However, in hydrocephalus, the ependyma is massively disrupted and not regenerated. Then, in most ventricle surfaces, the ependyma is replaced by a particular layer of reactive astrocytes whose functions are explained in the last section of this review. In the DLG5 knockout mouse and the *hyh* mutant mouse,^{46,47} the neuroepithelium is disrupted in the ventricular areas with postnatal neurogenesis and they present an impairment of the subventricular zone niches.

that is tightly coupled to the anterior-posterior neuroaxis. CSF accumulation and hydrocephalus occur when the flow is disturbed. This orientation is defined by an ependymal planar polarity, which is acquired during development in a multi-step process involving two independent mechanisms of the movement of the cilia basal bodies: translational and rotational.^{48,49} Planar polarity during development is also important for the closure of the spinal neural tube.⁵⁰ Thus, the consequences of failure in planar polarity include neural tube defects, including spina bifida and hydrocephalus. In the radial glial cells, the precursors of ependymal cells, primary cilia appear to play a key role in the development of planar polarity. Basal body translational position movement occurring in radial glial progenitors depends on the primary cilium, thus orchestrating the planar architecture of radial glial cells and translating the planar polarization to their progeny of ependymal cells.⁴⁸ The movements of the basal bodies occur in connection with microtubules, actin, non-muscle myosin II, and cytokeratin and most likely also in relation with apical junctions.^{51,52} For rotational movement, an independent signaling pathway is involved that includes Dishevelled2, Vangl2, Celsr2 and Celsr3, which are required for ependymal motile cilia to establish the polarized fluid flow.^{49,52-54} Additionally, the passive flow of the CSF plays a refining role in the rotational orien-



tion of the basal bodies during ependymal differentiation,^{49,55} orientation that is locked when the ependyma matures.⁵³

Primary ciliary dyskinesia, also known as immotile cilia syndrome, results as a defect in ciliary and flagellar motility, and hydrocephalus is present along with other pathologies, such as situs inversus, that affect left-right

asymmetry and cortical maldevelopment.¹⁶ Thus, the disturbed expression of several genes in mice models has been found to cause primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus.¹⁶ Mouse strains that present differential susceptibility to hydrocephalus are associated with primary ciliary dyskinesia, which is higher than in humans.¹⁶ This difference may be explained by the

Figure 2 (opposite). Development and properties of the multiciliated ependyma in the ventricle of the mouse. **(A, B, and C).** The neuroepithelial **(A and B)** and ependymal **(C)** cells express N-cadherin-containing junctions (in green, arrows) in their lateral plasma membrane domains, which are detected in transversal **(A)** and tangential views **(B)**. **(D and E)** Multiciliated ependymal cells are joined with connexin43-containing (Cnx43) gap junctions (in green, arrow) that are appreciated in transversal **(D)** and tangential **(E)** views. **(F)** Multiciliated ependymal cells lack tight junctions, as shown with lanthanum nitrate applied to the ventricle and observed under transmission electron microscopy. The tracer (with black electron density, white arrows) is present passing through the lateral winding extracellular spaces (white arrowheads), proving the absence of functional tight junctions. Motile cilia (blue arrow) and microvilli (red arrow) are appreciated in the luminal pole of ependymocytes. **(G)** Aquaporin 4 (AQP4) is present in the laterobasal domain of multiciliated ependyma. **(H)** At the transmission electron microscope, multiciliated ependyma takes HRP applied in vivo into the ventricle, and the tracer is incorporated into the pynocytic vesicles and early endosomes (in black electron dense reaction, white arrow). The tracer is also observed in the lateral winding extracellular spaces (white arrowhead). **(I)** Early endosomes (detected with EEA1 in yellow, white arrow) are detected at the apical pole of multiciliated ependyma. **(A and B)** Micrographs represent Z-plane projections under confocal microscopy in 40- μm -thick frozen sections. **(E and I)** Micrographs represent 1 μm thick planes under confocal microscopy. **(C and D)** Micrographs are taken under fluorescent microscopy in a 10- μm -thick paraffin sections. Tubulin βIV (tub βIV) immunofluorescence is shown (in red) in cilia labeling in **C, D** and **I**. **(A, B, E, and I)** Micrographs present DAPI nuclear immunostaining (in blue). Abbreviations: v, ventricle lumen. Bars: A, C-E, G, 10 μm ; B, 40 μm ; F, 50 nm; H, 1 μm , I, 5 μm .

segregation of genetic modifiers encoding proteins involved in ciliary function, brain development, and physiology.¹⁶ Hydin is one of the proteins involved in primary cilia dyskinesia and is present in the central pair of microtubules of the 9+2 axoneme present in motile cilia, where it is implicated in the regulation of the dynein arm activity.⁵⁶ Mutations in hydin create cilia that are incapable of beating and generating fluid flow. Hydin has been found to be mutated in the hy3 mouse that develops hydrocephalus.⁵⁷ Defects in hydin and in the central pair of microtubules are also associated with hydrocephalus in humans.⁵⁸ The mutation in the spindle-like microcephaly-associated protein, which shares some homology with hydin, is also associated with cerebral cortex maldevelopment that promotes microcephaly.⁵⁹ Motile ciliogenesis and maturation of the ependyma depends on the forkhead transcription factor Foxj1 through the regulation of the transport of γ tubulin-containing basal bodies toward the apical surface, most likely through the kinesin motor proteins kif9 and kif27.⁶⁰ Foxj1 knockout mice present hydrocephalus but not aberrant left/right asymmetry, and their ependyma is devoid of cilia.⁶⁰ Foxj1 is implicated in the control of the expression of ankyrin-3, an adaptor molecule that organizes membrane domains in the radial glial cell progenitors of ependymal cells.⁶¹ Ciliary function is also regulated by polycystin-1, a very large, highly glycosylated plasma receptor present in intercellular junctions and in the cilia of ependymal cells.⁶² In mice, knocking in this gene causes hydrocephalus with ependyma displaying morphologically normal cilia.⁶²

Cell Junctions in the Development of the Ependyma are Involved in Hydrocephalus and Associated Malformations

Currently, there is a growing body of evidence regarding the involvement of cell junctions during ependymal development in the triggering and the evolution of hydrocephalus, which has recently been reviewed by Rodríguez et al.¹⁷ This evidence includes results from animal models and studies in humans. A consequence of the alteration in cell junctions is the disruption of the natural barriers between the CSF and brain with developing or mature parenchyma, which leads to developmental and physiological abnormalities associated with hydrocephalus. A common sign of the maldevelopment of the neuroepithelial/

ependyma cell junctions is the presence of anomalous ependymal organizations forming rosettes.⁶³ In human fetuses, ependymal rosettes are commonly present in cases with hydrocephalus (unpublished observations of the authors),⁵ including cases with fetal spina bifida aperta,⁶⁴ and defects in CNS development, such as lissencephaly and pachygyria.⁶⁵ Abnormalities in neurogenesis and corticogenesis are also suggested to involve the disruption of the germinal ventricular and subventricular zones.¹⁷ A third consequence of the neuroepithelial/ependymal disruption is the manifestation of obstructions of narrow ventricles, such as the aqueduct, which occurs in the form of non-communicating hydrocephalus.

The disruption in the regulation of apical polarity affects the organization of cell junctions in the neuroepithelium/ependyma and leads to hydrocephalus, as observed in the inactivation of the atypical protein Kinase C (aPKC),⁶⁶ and the *Drosophila* Lethal giant larvae Lgl1 homolog.⁶⁷ Rosettes in the neuroepithelium are also present in the latter model.⁶⁷

Cadherins, the primary calcium-dependent cell junction molecules present in the CNS, appear to play key roles in the adherens junctions in both the neuroepithelium and ependyma (Fig. 1D, E; Fig. 2A-C).^{68,69} In respect to the neuroepithelium, blocking N-cadherin in chick embryos gives rise to its disruption with the consequent formation of periventricular anomalous development of the ependyma that forms rosettes.⁷⁰ The non-muscle myosin II-B interacts with N-cadherin containing junctions in the neuroepithelium. When the function of myosin II-B is ablated in mice, the neuroepithelial cells lose their cell adhesion ability, and in all the experimental mice hydrocephalus is developed.⁷¹ Myosin IXa presenting a Rho GTPase-activating domain is expressed and needed during the maturation of ependymal cells.⁷² The experimental inhibition of myosin IXa in mice leads to the alteration in morphology and junctions of the ependyma and in their differentiation.⁷² N-cadherin is present in the cell junctions of mature multiciliated ependymal cells in mice and humans (Fig. 1D, E; Fig. 2C).^{64,73} These junctions are essential for the integrity of the cell layer, and massive death of the ependymal cells occurs via apoptosis when N-cadherin is experimentally blocked.⁷⁴ E-cadherin is also present at the cell border of mature ependyma cells, presumably regulated by Numb and implicated in maintaining ependymal integrity.⁴⁴ The levels of E-cadherin are found to be altered in rats infused with vascular endothelial growth factor (VEGF).⁷⁵ In these rats, VEGF appears

to phosphorylate and activate the receptor VEGFR2 in the ependyma, which exhibits alterations and partial denudation.⁷⁵ This evidence has been linked to the origin of hydrocephalus in human cases where higher levels of VEGF have been recorded.⁷⁵

In the *hyh* mutant mouse, a defect in the vesicular traffic mediated by α SNAP can explain the alteration of the fate of molecules that are present in adherens junctions.^{17,76} This defect in the formation of adherens junctions can trigger the disruption of the neuroepithelium, which has been shown to be associated with a prenatal and early postnatal mild ventriculomegaly and communicant hydrocephalus.⁷⁷⁻⁷⁹ In the *hyh* mouse, later in the postnatal development, the obstruction of the narrow aqueduct due to the absence of neuroepithelium/ependyma leads to a severe non-communicant hydrocephalus.⁸⁰ In another mouse model with DLG5 knocked out, the migration of cadherin-containing vesicles and their delivery of cell junction molecules appear to be altered.⁴⁶ Similar to the *hyh* mouse, a disruption in the formation of the ependyma occurred and was followed by aqueduct stenosis, leading to severe hydrocephalus.⁴⁶

In human fetuses with hydrocephalus, observations in the last decade point in the same direction as the aforementioned animal models.^{64,81,82} In fetuses with spina bifida aperta and hydrocephalus, N-cadherin cell junctions are abnormally located preceding their disruption in the cells of the ventricular zone of ventricle walls including the aqueduct.⁶⁴ These observations strongly suggest that defects in the ependymal lineage are implicated in the origin of hydrocephalus and in the obliteration of the aqueduct in human.

Interestingly, secondary forms of hydrocephalus that appear in the intraventricular hemorrhage can be explained based on a neuroepithelial disruption. Thus, hydrocephalus defects in the ependyma have also been described in a posthemorrhagic rat model.⁸³ Recent evidence provided by Yung et al.⁸⁴ demonstrated that lysophosphatidic acid (LPA) present in the blood delivered in intracerebroventricular hemorrhages mediates the disruption of the neuroepithelium. In addition, the presence of LPA explains defects in neurogenesis that commonly are associated with fetal hydrocephalus.⁸⁴

In addition to the aforementioned role of the ependyma on the CSF composition and circulation,^{31,32} in the case of hydrocephalus, the disruption of the ventricular zone in hydrocephalus can also be implied in the existence of abnormal neurogenesis and corticogenesis in animal models and humans, which has been recently reviewed by Rodríguez et al.¹⁷ Some of these alterations could be explained by an abnormal proliferation of neural progenitors in the ventricular zone and by abnormal radial migrations caused by an absent scaffold of the basal processes of radial glial cells. The consequences of these alterations could include the displacement of progenitors into the ventricle lacking a neuroepithelial/ependymal barrier described in animal models and human,^{17,47,77,79,81} affectations of corticogenesis and the presence of periventricular heterotopias,⁷⁸ which are clusters of neuroblasts/neurons ectopically displaced near the lateral ventricles.⁸⁵

Experimental studies in mice have shown that alcohol exposure, which is sometimes associated with hydrocephalus and defects in the cortical development, alters the development of

the neuroepithelium in the midline during the neural tube formation, thus originating an enlargement and perforation of the ventricles.⁸⁶ Periventricular heterotopias are also present in rats with congenital hydrocephalus produced by the administration of ethanol during their development, thus indicating problems in the formation and migration of neuroblasts.⁸⁷

Ependyma as a Polarized Cell Barrier Between The Ventricular CSF And Brain Parenchyma

The presence of an ependymal barrier between the ventricular CSF and brain parenchyma is implicated in the flow of substances through both sides of the interface, which is disturbed after ependymal disruption in the presence of hydrocephalus. Mature ependymal cells are polygonal cells, cuboidal to the columnar depending on the ventricle location, which display polarized structural and functional organizations. At the basal pole, ependymal cells present basal lamina labyrinths that are remnants of basal lamina from embryonic capillaries. Apically, their luminal pole is in contact with the ventricular CSF, and the cells display microvilli and an average of 16 motile cilia (9+2 axoneme) per cell with a length of approximately 13 μ m.^{88,89} Throughout this review, these cells will be cited hereafter as multiciliated ependymal cells to differentiate them from other specialized ependymal cells, such as tanycytes, which are monociliated, and choroid plexus epithelial cells, which also present cilia.

Multiciliated ependymal cells are joined with adherens junctions. As explained above, the expression of cell junction molecules, such as cadherins, is important for the integrity of the neuroepithelium and ependyma, and the expression of these molecules changes during development. Thus, protocadherins 2A and 15 are present at stages most likely corresponding to radial glial cells.^{90,91}

The existence of abundant gap junctions has been widely demonstrated in ependymal cells.^{88,92} In particular, the mRNAs coding connexin43, connexin26, and connexin30 have been reported to be present in the mouse and rat ependyma.^{93,94} The connexin43 protein has been detected in the ependyma of mice (Fig. 2D, E) and humans.^{64,73,95} Connexins in the ependymal cells have been suggested to be regulated by the basic fibroblast growth factor (bFGF).⁹⁵ Gap junctions in ependymal cells are involved in electrical and metabolic couplings integrating the functioning of the cell layer. Gap junctions play a role in the synchronization of cilia beating and in CSF circulation.^{64,96} However, the presence of abundant gap junctions in specialized ependymal cells, such as monociliated tanycytes and non-ciliated α_1 -tanycytes, suggests that in these cell populations, coupling performs an unknown function different from beating cilia.^{97,98} Gap junctions have also been proposed to play a role in integrating ependymal function with underlying astroglia and the formation of panglial syncytium that regulates water and ion transport.⁹⁹

The arrangement of the cytoplasmatic organelles in the ependymal cells also displays polarization.^{73,88} The mature ependyma in mammals presents a cytoskeleton with a reduced presence of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) compared with radial

glial cells and immature ependyma. Instead of expressing GFAP, ependymocytes express vimentin.³⁸ In the ependyma, a highly ordered F-actin network forms part of the apical terminal bar complex, whose presence is suggested to be related with the organization of microvilli and with the reaction to different forces, including the factors derived from the CSF movement.¹⁰⁰ The presence of actin and myosin near the basal bodies is also related to the movement of cilia.⁶

The presence of tight junctions appears as a transient characteristic of the neuroepithelium that will give rise to the multiciliated ependyma but remains in specialized ependyma present in circumventricular organs. The early study of Brightman and Palay described the multiciliated ependyma presenting tight junctions (zonula occludens).⁸⁸ Nevertheless, immunolocalizations of molecules associated with tight junctions have revealed that if tight junctions are present, they are incomplete.^{101,102} In the apical pole, ependymal cells also present abundant gap junctions allowing for 2–4 nm extracellular spaces, which make extracellular spaces permeable to large molecules, including proteins and tracers (Fig. 2F).^{73,103} Recent studies have experimentally proven the presence of such extracellular permeable spaces between the ependymal cells that allow the passage of tracers, such as lanthanum nitrate and peptides.^{73,74,104} Proteins with dissimilar molecular weights, such as horseradish peroxidase and ferritin, which have molecular weights of 43 and 560 kDa, respectively, also pass through the ependymal extracellular spaces.^{105,106} The injection of labeled metabolites, such as [¹⁴C]sucrose and [¹⁴C]inulin, in the ventricles of rats has proven that the transependymal diffusion in the different ventricle walls depend on CSF circulation.^{107,108}

However, despite the presence of permeable extracellular spaces, experimental approaches have shown that multiciliated ependyma also represent a regulated barrier to the diffusion between the ventricle CSF and brain parenchyma. Thus, phorbol ester induces changes in the adherens junctions of ependymal cells,¹⁰¹ which are also altered by a mannose-dependent recognition system.¹⁰⁹ Currently, regardless of the absence of occluded pathways in their extracellular spaces, multiciliated ependyma is recognized as a partial barrier that regulates the transport and metabolism of some molecules in both directions through the ventricle-brain parenchyma interface.⁶

Ependyma presents regional structural and high functional specializations in such regions as the circumventricular organs, constituting the epithelial cells of the choroid plexus or the hypothalamic tanycytes. In such organs, tight junctions are absent in the endothelium vessels, which are fenestrated, and thus, they lack a blood-brain barrier. Therefore, circumventricular organs are neurohemal organs considered to be brain windows.¹¹⁰ The functional blood-CSF barrier consisting in hermetic apical tight junctions is in circumventricular organs displaced to the epithelial cells and tanycytes.¹¹⁰ Tanycytes present radially directed basal processes that extend for a variable distance into subadjacent neuropile, enwrapping blood vessels or terminating on neurons, glial, or in the external glial limitans.³⁸ Choroid plexus epithelial cells produce secretions and the main proportion of CSF, which fills the ventricles, spinal cord canal, and subarachnoid spaces. Choroid plexus constitutes an open window to systemic

circulation that results as a location of penetration for toxicants and pathogens in the CNS.¹⁰³

Consequently, three barriers with different properties are considered in the CNS, a blood-brain barrier at the blood vessels, a blood-CSF barrier at the choroid plexus and the arachnoid membrane, and a CSF-brain parenchyma barrier at the ependyma. Only the two first barriers involve the sealing of extracellular spaces with tight junctions. The ependyma would constitute a partial barrier, depending on the substances transported.

Role of Ependyma in Ventricle CSF Production and Circulation

The choroid plexus produces most of the CSF. The CSF and blood plasma compositions are very similar, with the only major difference being the significantly lower concentration of proteins in the CSF. The highly specialized ependymal cells of the choroid plexus produce CSF by appropriate machineries for ionic transport and the secretion of different molecules. A source of extrachoroidal CSF exists that ranges between 30% and 60% of the total CSF.¹¹¹ This CSF originates from the interstitial brain parenchyma that reaches the ventricle through the permeable barrier of the multiciliated ependyma.

The CSF plays important roles in CNS physiology, including absorbing mechanical and thermal stress, removing waste products that form in the CNS (sink action), creating an appropriate extracellular molecular composition, and transporting humoral mediators and nutrients.¹⁰³ Thus, it forms the third circulatory system, in which the CSF is simultaneously a source and sink for distributing molecules. The multiciliated ependyma, as a permeable partial barrier at the CSF-brain parenchyma, also plays an important role in the balance of molecule transport between the ventricular CSF and interstitial fluid.¹⁰³

CSF circulation is driven by its production rate (volume) and the vasculature pulsatile kinetics.¹¹²⁻¹¹⁴ The directed and coordinated beating of ependymal cilia into the ventricle also appears to contribute to CSF circulation.⁸⁹ The cilia beating in the mammalian ependyma ranges between 28 and 40.7 Hz and is inhibited by serotonin,^{16,115} which is most likely released from a supraependymal axon network arising from the raphe nuclei.¹¹⁶ Furthermore, ATP and the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) modulate ciliary activity.^{89,115,117} The melanin-concentrating hormone exerts control in the third ventricle.¹¹⁸ Ependymal cells express D1 and D2 dopamine receptor subtypes, and dopamine can be released from subependymal axons to modulate ciliary functions.¹¹⁹

CSF circulation is disturbed and slowed when motile cilia development is altered in mice.⁵⁴ Ciliary beating is particularly important for circulation through narrow canals, such as the cerebral aqueduct, allowing for laminar flow near the ventricle wall surface.¹⁰ Mutations in genes implicated in the assembly or structure of ependymal motile cilia, such as *Mdnab*, *Ift88*, *hy3*, *Celsr2*, and *Celsr3*, have been found to alter the CSF dynamics and result in hydrocephalus.^{54,96,120-122} Nevertheless, hydrocephalus should be considered because ciliated epithelial cells of choroid plexus

are also affected and implicated in CSF production. The beating direction of cilia in the ependymal cells of the lateral ventricles is also important for the migration of young neurons generated in neurogenic niches in the subventricular zone.¹²³

Sialic acid is a negatively charged sugar present in glycoproteins or glycolipids that constitute the glycocalyx of ependymal cells at their luminal pole (Fig. 1B, C). Sialic acid has been suggested as a regulator for cellular and molecular interactions, cell masking in innate immunity, recognition and signaling, molecular protection against proteolytic attack, and providing a charged filtration barrier and a protective electrical shield for repulsion.¹²⁴ The existence of abundant sialic acid in glycocalyx at the luminal pole of the multiciliated ependyma suggests a role of this barrier in CSF circulation and likely in transependymal permeability. Thus, the presence of sialic acid maintains a hydrated film to allow for a laminar regimen of CSF circulation near the ventricle wall.^{10,124} Sialic acid could also exert repulsive forces between the ventricle walls in narrow ventricles, such as the aqueduct or spinal cord central canal (Fig. 3A).^{10,124} Sialic acid is also abundant in the glycoproteins of the Reissner's fiber, a structure that is secreted by the specialized secretory ependyma of the subcommissural organ at the entrance of the aqueduct.¹⁰ The Reissner's fiber runs caudally, reaching the end of the narrow spinal cord central canal.¹⁰ The potential functions of Reissner's fiber include the facilitation of CSF circulation through narrow conduits and restraining the closing of the aqueduct.^{10,125-127} However, it remains intriguing that in humans, the subcommissural organ is only present in the fetus and children, secreting glycoproteins that do not form a Reissner's fiber.¹²⁸ Experimental results support the hypothetical functions suggested for sialic acid present in both the ependyma and Reissner's fiber in relation to CSF circulation and hydrocephalus. The removal of sialic acid in the ependyma of rats with bacterial and viral neuraminidases leads to multiciliated ependyma disruption,^{43,129} indicating that the presence of sialic acid is important for the ependymal integrity, as in other barriers, such as the pulmonary endothelium.¹³⁰ The intracerebroventricular administration of neuraminidase in rats also disrupts the molecular assembly of the highly sialylated glycoproteins that form the Reissner's fiber.¹²⁹ In these rats, a consequent fusion of the ventricle walls exists in the aqueduct and a non-communicant hydrocephalus.¹²⁶

The possibility that alterations of the subcommissural play a role in the pathogenesis of hydrocephalus has been suggested in animal models and humans and reviewed by Meinie.¹³¹ However, it remains obscure whether the alterations in the subcommissural organ in human fetuses are primary or epiphenomenal,¹³² which may also occur in the case of rats deficient in folic acid or B12 vitamin.¹³³ It is difficult to claim the basis of the relationship between an altered subcommissural organ and the occlusion of the cerebral aqueduct and hydrocephalus. In several cases, the subcommissural organ, the ciliogenesis of multiciliated ependyma, and the choroid plexus epithelial cells are all affected, as occurs in mice deficient in the Regulatory factor X (RFX).^{121,134} Concurrence occurs in the subcommissural organ defects, ependymal alterations, and hydrocephalus with aqueductal stenosis/obliteration in mice overexpressing the gene for the pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1,¹³⁵ displaying the inactivation of the huntingtin homolog Hdh and deficient in the homeodomain transcription factor Msx1.^{136,137} Nevertheless, in several cases, strong evidence supports the implication of the subcommissural organ in the origin of non-communicant hydrocephalus. First, the experimental immunological blockage of the Reissner's fiber of maternally delivered antibodies during the development in rats produces aqueduct stenosis.¹³⁸ Second, a tight association of the impairment in the subcommissural organ secretion with the aqueduct stenosis occurs in the H-Tx rat, which is a well-characterized model of congenital hydrocephalus.¹³⁹

Role of the Ependyma in Water Transport

Aquaporins constitute a family of water channel proteins that plays relevant roles in brain water physiology through barriers, including the ependyma. Aquaporins are tetramers of proteins surrounding a water pore that transport water in both directions. One of the members of the family, aquaporin 1, is located in the apical membrane of the specialized ependymal cells the choroid plexus.¹⁴⁰ In the choroid plexus, aquaporin 1 is involved in the water transport, following osmotic gradient, from the blood to the ventricles for the CSF formation.¹⁴¹ Accordingly, aquaporin 1 null mice present a reduced CSF production and, consequently, a lower intracranial pressure.¹⁴² Oowler et al. 2010 have recently reviewed the responses of aquaporins in changes of CSF pressure in cases of hydrocephalus.¹⁴³ Aquaporin 4 is the principal member of the family present in the mammalian brain, located primarily at the borders between brain parenchyma and major fluid compartments, with a particular prevalence in periventricular areas.¹⁴⁴ Thus, it is present in astrocyte perivascular endfeet, in the glia limitans at the border with the subarachnoid CSF, in periventricular astrocytes, and in the ependyma.¹⁴⁵ Aquaporin 4 is regulated by reversible protein phosphorylation and protein-protein interactions and is likely to play a key role in the transduction or amplification of signals involved in the osmosensory feedback control of systemic salts and water balance.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Aquaporin 4 regulates water flow through the brain parenchyma-ventricle CSF interface and at the blood brain barrier.¹⁴⁹ In the case of the astrocytes perivascular and pial endfeet, water flow outward along with K⁺ passing through Kir4.1 potassium channels may occur.¹⁴⁸ Aquaporin 4 could participate in intracranial pressure adjustments enhancing interstitial fluid reabsorption into brain capillaries.^{141,150} Similar to other epithelia, in multiciliated ependymal cells, aquaporin 4 is located in the basolateral plasma membranes (Fig. 2G),^{73,145} and this location results in a directed water flow. Aquaporin 4 in the multiciliated ependyma is also most likely involved in maintaining their structural and functional integrity and also in the arrangement of the connexin43-containing gap junctions.^{151,152}

Aquaporin 4 appears to play a key role in the presence of edema and CSF accumulations occurring in hydrocephalus.¹⁵³ In hydrocephalus, edema is considered caused by CSF extravasation through ependyma reaching interstitial fluid. In

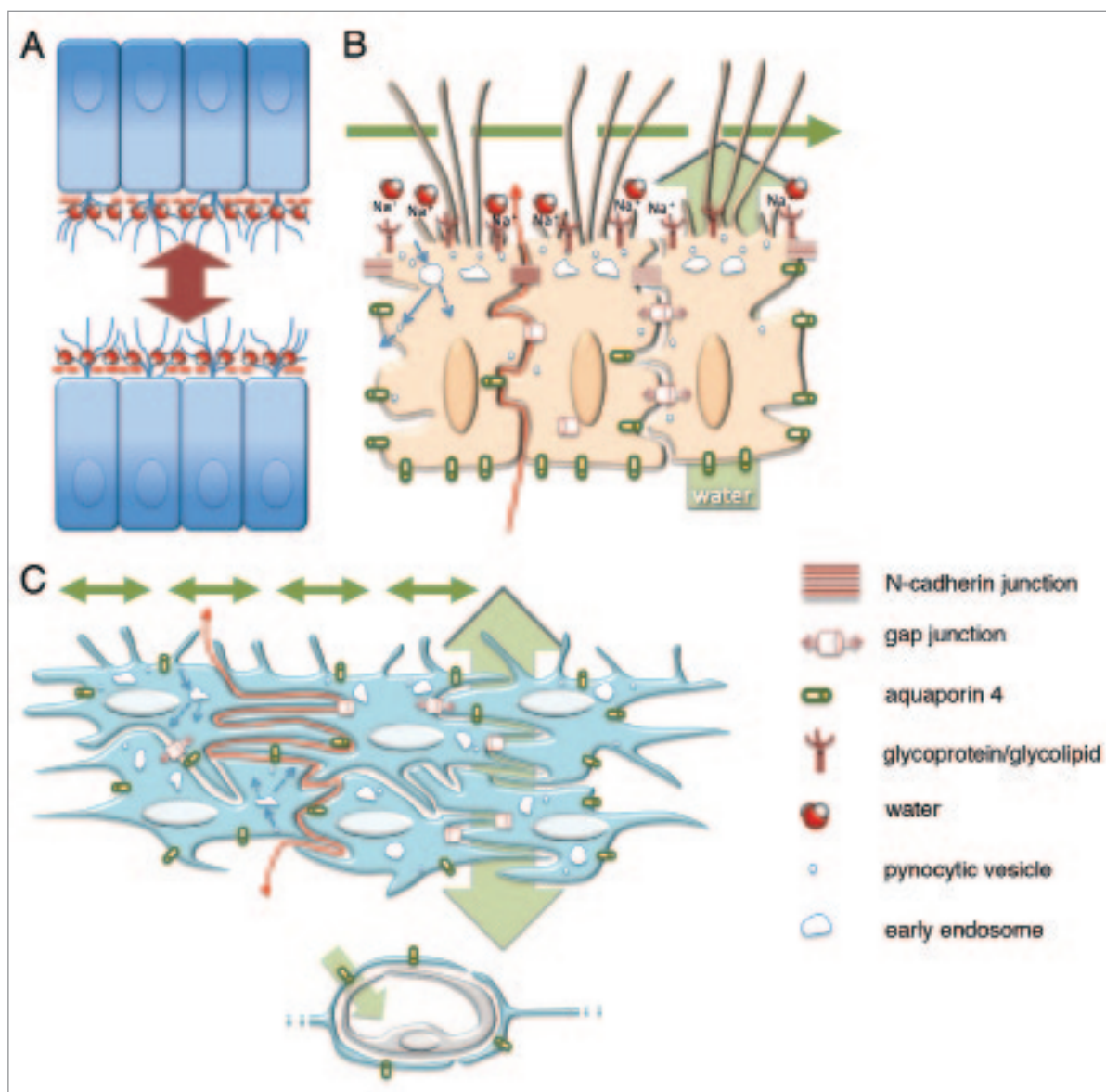


Figure 3. Schematic representation of the probable barrier roles played by the ependyma and the astrocyte reaction in health and hydrocephalus. **(A)** Sialic acid negative charges (- symbol in red) are present at the apical surface of multiciliated ependyma, which allows for repulsive forces and CSF circulation in narrow ventricle cavities and for a water film that facilitates the laminar flow of CSF. **(B)** The ependyma lacks tight junctions that allow the diffusion of molecules and ions toward the CSF (red arrow) through winding extracellular spaces. The polarized distribution of aquaporin 4 drives water transport in the same direction (green arrow behind the ependyma). Motile cilia mediate CSF transport at the luminal side (green broken arrow). Probable pynocytosis and transcytosis are represented at the apical pole of ependymal cells taking substances from the ventricle (blue arrows). Gap and adherens junctions are represented. **(C)** The hypothetical role of the layer containing reactive astrocytes covering ventricle walls with ependymal disruption. The mechanisms operating that attempt to reestablish homeostasis at both sides of the barrier are shown lacking the polarization present in the ependyma. Transport of water driven by astrocyte endfeet (asterisk) and non-polarized transports of CSF through the ependyma (double-end green arrow behind the reactive astrocyte cell layer) and into the ventricle (double-end green arrows into the ventricle lumen) are represented.

agreement with a protective role in hydrocephalus, aquaporin 4 is upregulated in rats with induced hydrocephalus,¹⁵⁴ and a correlation occurs between aquaporin 4 expression and the apparent diffusion coefficient in periventricular edema, calculated with magnetic resonance imaging (MRI).¹⁵⁵ In rats with induced hydrocephalus, aquaporin 4 facilitates the clearance of CSF into the parenchymal vasculature.¹⁵⁶ A higher expression of aquaporin 4 in the periventricular

astrocytes has been correlated with the severity of hydrocephalus in animal models.¹⁵⁰ Similarly, evidence supports a role of aquaporin 4 in humans with hydrocephalus.¹⁵⁷

Therefore, aquaporins can be considered potential therapeutic targets that act either on the regulation of the CSF production in the choroid plexus, on the interstitial CSF reabsorption, and/or on the edema formation in the different forms of hydrocephalus.^{141,143,153}

Multiciliated Ependyma as an Immunological Barrier

The multiciliated ependyma has been suggested to contribute to immunological processes. The specialized ciliated ependyma of the choroid plexus forming the blood-CSF barrier is considered one of the main routes of cellular infiltration into the CNS during normal conditions. However, in infectious and inflammatory conditions, the damaged barrier of multiciliated ependyma has been reported to be the predominant source of leukocyte infiltration reaching the ventricle.¹⁰² Thus, the multiciliated ependyma is an immunologically active site that, upon activation, produces effector molecules, which would support leukocyte transmigration.¹⁵⁸ The presence of the intercellular adhesion molecule ICAM-1 and the vascular adhesion molecule VCAM-1 on the ependymal microvilli supports this function.¹⁵⁹ In endothelial cells, vimentin has been found to play an important role in regulating this barrier in lymphocyte diapedesis.¹⁶⁰ A similar role may be postulated for the presence of vimentin being expressed by the ependyma.

Role of Glial Reactions after the Disruption of the Ependyma

During development, the appearance of hydrocephalus and ventriculomegaly in animal models and humans is associated with important damages in the cortical myelin, which triggers astroglial and microglial reactions.^{64,78,81,161,162} Reactions of astrocytes and microglia can be induced by increased intracranial pressures. Accordingly, intraventricular CSF drainage through shunting in H-Tx rats with congenital hydrocephalus and in feline with experimental hydrocephalus has been shown partially preventing or reducing the astrocyte reaction.^{163,164} In the hyh mouse model, part of reactive astrocytes form a new cell layer that covers the ventricular walls denuded of multiciliated ependyma.^{73,78} This particular reaction also occurs in other animal models with hydrocephalus, such as the H-Tx rat (unpublished

observations by the authors), after the induced disruption of the ependyma in rats using intracerebroventricular injections of neuroaminidase,⁴³ and in human fetuses presenting primary hydrocephalus and spina bifida aperta.^{64,81} Several morphological and functional characteristics of reactive astrocytes partially resemble the ependyma, such as presenting microvilli in contact with the ventricle lumen, aquaporin 4, caveolae, paracellular permeability, and the cellular mechanism that is implicated in the endocytosis or transcytosis of molecules through the new barrier (Fig. 1F; Fig. 2G, H, I; Fig. 3B, C).⁷³ In contrast to the ependyma, the reactive astrocytes would not function displaying the same functional polarization; however, they are proposed as an attempt to reestablish homeostasis at both sides of the ventricle interface.⁷³ Similar to the hyh mouse, this astrocyte barrier is present in human cases with congenital hydrocephalus, where the barrier may also play similar functions.^{73,81}

Conclusion

The ependyma has been widely considered as a barrier with poorly defined functions. However, the number of investigations that recognize the important roles for the neuroepithelium and mature ependyma in the development and physiology of the CNS is expanding. The knowledge of these roles furthers the understanding of the etiology of developmental and related diseases, such as hydrocephalus, and is useful for the design of new therapeutic approaches.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Supported by grants SAF2010–19087 (Ministerio de Educación Cultura y Deporte, Spain) and P-11-CVI-07637 (Junta de Andalucía, Consejería de Economía Innovación y Ciencia, Spain) to PF-LL, and PI12/0631 (Instituto de Salud Carlos III, Spain) to AJJ.

References

- Lowery LA, Sive H. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *Bioessays* 2009; 31:446-58; PMID:19274662; <http://dx.doi.org/10.1002/bies.200800207>
- Bruni JE, Del Bigio MR, Clattenburg RE. Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain Res* 1985; 356:1-19; PMID:3888350; [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173\(85\)90016-5](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173(85)90016-5)
- Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 1998; 41:2-13; PMID:9550133; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z)
- Sarnat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 1992; 8:163-78; PMID:1622511; [http://dx.doi.org/10.1016/0887-8994\(92\)90063-5](http://dx.doi.org/10.1016/0887-8994(92)90063-5)
- Sarnat HB. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54:1-15; PMID:7815072; <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199501000-00001>
- Del Bigio MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 1995; 14:1-13; PMID:7615341; <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440140102>
- Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119:55-73; PMID:20024659; <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-009-0624-y>
- Oi S. Hydrocephalus research update--controversies in definition and classification of hydrocephalus. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2010; 50:859-69; PMID:20885121; <http://dx.doi.org/10.2176/nmc.50.859>
- McKechnie L, Vasudevan C, Levene M. Neonatal outcome of congenital ventriculomegaly. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012; 17:301-7; PMID:22819382; <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2012.06.001>
- Pérez-Figares JM, Jimenez AJ, Rodríguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 2001; 52:591-607; PMID:11241868; [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7)
- McAllister JP 2nd. Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012; 17:285-94; PMID:22800608; <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2012.06.004>
- Peña A, Harris NG, Bolton MD, Czosnyka M, Pickard JD. Communicating hydrocephalus: the biomechanics of progressive ventricular enlargement revisited. *Acta Neurochir Suppl* 2002; 81:59-63; PMID:12168357
- Levine DN. Intracranial pressure and ventricular expansion in hydrocephalus: have we been asking the wrong question? *J Neurol Sci* 2008; 269:1-11; PMID:18234229; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.12.022>
- Rekate HL. A consensus on the classification of hydrocephalus: its utility in the assessment of abnormalities of cerebrospinal fluid dynamics. *Childs Nerv Syst* 2011; 27:1535-41; PMID:21928019; <http://dx.doi.org/10.1007/s00381-011-1558-y>
- Zhang J, Williams MA, Rigamonti D. Genetics of human hydrocephalus. *J Neurol* 2006; 253:1255-66; PMID:16773266; <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-006-0245-5>

16. Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *J Neurosci Res* 2013; 91:1117-32; PMID:23686703; <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23238>
17. Rodríguez EM, Guerra MM, Vío K, González C, Ortlöf A, Bátiz LF, Rodríguez S, Jara MC, Muñoz RI, Ortega E, et al. A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. *Biol Res* 2012; 45:231-42; PMID:23283433; <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602012000300005>
18. Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex N Y N* 1991 2003; 13:541-9.
19. Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:653-79; PMID:21801012; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154026>
20. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:777-88; PMID:16314867; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1739>
21. Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol* 2009; 327:263-72; PMID:19154733; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.029>
22. Desmond ME, Duzy MJ, Federici BD. Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *Dev Dyn* 1993; 197:291-306; PMID:8292826; <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001970407>
23. Zhang J, Piontek J, Wolburg H, Piehl C, Liss M, Otten C, Christ A, Willnow TE, Blasig IE, Abdelilah-Seyfried S. Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:1425-30; PMID:20080584; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911996107>
24. Gutzman JH, Sive H. Epithelial relaxation mediated by the myosin phosphatase regulator Mypt1 is required for brain ventricle lumen expansion and hindbrain morphogenesis. *Development* 2010; 137:795-804; PMID:20147380; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.042705>
25. Lowery LA, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the nagie oko and snakehead/atp1a1a.1 gene products. *Development* 2005; 132:2057-67; PMID:15788456; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01791>
26. Bátiz LF, Jiménez AJ, Guerra M, Rodríguez-Pérez LM, Toledo CD, Vío K, Páez P, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM. New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 2011; 121:721-35; PMID:21311902; <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-011-0799-x>
27. Dziegielewska KM, Hinds LA, Møllgård K, Reynolds ML, Saunders NR. Blood-brain, blood-cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid-brain barriers in a marsupial (*Macropus eugenii*) during development. *J Physiol* 1988; 403:367-88; PMID:3075668
28. Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. *Neurotoxicology* 2012; 33:586-604; PMID:22198708; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2011.12.009>
29. Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:85-91; PMID:10065326; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.02987.x>
30. Martín C, Alonso MI, Santiago C, Moro JA, De la Mano A, Carretero R, Gato A. Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci* 2009; 27:733-40; PMID:19540909; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.06.002>
31. Mashayekhi F, Draper CE, Bannister CM, Pourghasem M, Owen-Lynch PJ, Miyajima JA. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain* 2002; 125:1859-74; PMID:12135976; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awf182>
32. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F, Bannister CM, Miyajima JA. Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain* 2003; 126:623-31; PMID:12566283; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awg058>
33. Sánchez-Camacho C, Rodríguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 49:242-52; PMID:1611553; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.10.004>
34. del Brío MA, Riera P, Muñoz RI, Montecinos H, Rodríguez EM. The metencephalic floor plate of chick embryos expresses two secretory glycoproteins homologous with the two glycoproteins secreted by the subcommissural organ. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:415-26; PMID:10933218
35. del Brío MA, Riera P, Peruzzo B, Rodríguez EM. Hindbrain floor plate of the rat: ultrastructural changes occurring during development. *Microsc Res Tech* 2001; 52:615-26; PMID:11241870; [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<615::AID-JEMT1045>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<615::AID-JEMT1045>3.0.CO;2-V)
36. Richter HG, Muñoz RI, Millán CS, Guinazú MF, Yulis CR, Rodríguez EM. The floor plate cells from bovines express the mRNA encoding for SCO-spondin and its translation products. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 93:137-47; PMID:11589991; [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00181-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00181-4)
37. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 2005; 25:10-8; PMID:15634762; <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>
38. Bruni JE. Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 1998; 41:2-13; PMID:9550133; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z)
39. Lavado A, Oliver G. Six3 is required for ependymal cell maturation. *Development* 2011; 138:5291-300; PMID:22071110; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.067470>
40. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex N Y N* 1991 2003; 13:580-7.
41. Sanai N, Nguyen T, Ibric RA, Mirzadeh Z, Tsai H-H, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, García-Verdugo J-M, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 2011; 478:382-6; PMID:21964341; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10487>
42. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000; 28:713-26; PMID:11163261; [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
43. Del Carmen Gómez-Roldán M, Pérez-Martín M, Capilla-González V, Cifuentes M, Pérez J, García-Verdugo JM, Fernández-Llèbrez P. Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *J Comp Neurol* 2008; 507:1571-87; PMID:18236450; <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21618>
44. Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, Sestan N, García-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Jan LY, et al. Postnatal deletion of Numb/Numbl reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell* 2006; 127:1253-64; PMID:17174898; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.041>
45. Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC. Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 2008; 28:3804-13; PMID:18385338; <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0224-08.2008>
46. Nechiporuk T, Fernandez TE, Vasioukhin V. Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in *Dlg5*^{-/-} mice. *Dev Cell* 2007; 13:338-50; PMID:17765678; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.017>
47. Jiménez AJ, García-Verdugo JM, González CA, Bátiz LF, Rodríguez-Pérez LM, Páez P, Soriano-Navarro M, Roales-Buján R, Rivera P, Rodríguez S, et al. Disruption of the neurogenic niche in the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68:1006-20; PMID:19680142; <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b44a5a>
48. Mirzadeh Z, Han Y-G, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci* 2010; 30:2600-10; PMID:20164345; <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3744-09.2010>
49. Kishimoto N, Sawamoto K. Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation* 2012; 83:586-90; PMID:22101065; <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2011.10.007>
50. Wallingford JB. Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2006; 15:R227-34; PMID:16987888; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl216>
51. Hirota Y, Meunier A, Huang S, Shimozawa T, Yamada O, Kida YS, Inoue M, Ito T, Kato H, Sakaguchi M, et al. Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development* 2010; 137:3037-46; PMID:20685736; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.050120>
52. Wallingford JB. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:597-604; PMID:20817501; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2010.07.011>
53. Guirao B, Meunier A, Mortaud S, Aguilar A, Corsi J-M, Strehl L, Hirota Y, Desoeuvre A, Boutin C, Han Y-G, et al. Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nat Cell Biol* 2010; 12:341-50; PMID:20305650; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2040>
54. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Ytteca D, Courtoy P, et al. Lack of cadherins *Celsr2* and *Celsr3* impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci* 2010; 13:700-7; PMID:20473291; <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2555>
55. Mitchell B, Jacobs R, Li J, Chien S, Kintner C. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* 2007; 447:97-101; PMID:17450123; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05771>

56. Lechtreck K-F, Delmotte P, Robinson ML, Sanderson MJ, Witman GB. Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *J Cell Biol* 2008; 180:633-43; PMID:18250199; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200710162>
57. Davy BE, Robinson ML. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1163-70; PMID:12719380; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg122>
58. Doggett NA, Xie G, Meincke LJ, Sutherland RD, Mundt MO, Berbari NS, Davy BE, Robinson ML, Rudd MK, Weber JL, et al. A 360-kb interchromosomal duplication of the human HYDIN locus. *Genomics* 2006; 88:762-71; PMID:16938426; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.07.012>
59. Ponting CP. A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene. *Bioinformatics* 2006; 22:1031-5; PMID:16443634; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl022>
60. Jacquet BV, Salinas-Mondragon R, Liang H, Therit B, Buie JD, Dykstra M, Campbell K, Ostrowski LE, Brody SL, Ghashghaei HT. FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development* 2009; 136:4021-31; PMID:19906869; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.041129>
61. Paez-Gonzalez P, Abdi K, Luciano D, Liu Y, Soriano-Navarro M, Rawlins E, Bennett V, Garcia-Verdugo JM, Kuo CT. Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron* 2011; 71:61-75; PMID:21745638; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.029>
62. Wodarczyk C, Rowe I, Chiaravalli M, Pema M, Qian F, Boletta A. A novel mouse model reveals that polycystin-1 deficiency in ependyma and choroid plexus results in dysfunctional cilia and hydrocephalus. *PLoS One* 2009; 4:e7137; PMID:19774080; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007137>
63. Johanson CE, Szymdynger-Chodobska J, Chodobska A, Baird A, McMillan P, Stopa EG. Altered formation and bulk absorption of cerebrospinal fluid in FGF2-induced hydrocephalus. *Am J Physiol* 1999; 277:R263-71; PMID:10409281
64. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WFA, Bätz LF, Alvial G, Castañeyra-Perdomo A, Rodríguez EM. Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol* 2011; 21:163-79; PMID:21269337; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00432.x>
65. Sarnat HB, Darwish HZ, Barth PG, Trevenen CL, Pinto A, Kotagal S, Shishikura K, Osawa M, Korobkin R. Ependymal abnormalities in lissencephaly/pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52:525-41; PMID:8360705; <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199309000-00011>
66. Imai F, Hirai S, Akimoto K, Koyama H, Miyata T, Ogawa M, Noguchi S, Sasaoka T, Noda T, Ohno S. Inactivation of aPKC λ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 2006; 133:1735-44; PMID:16571631; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02330>
67. Klezovitch O, Fernandez TE, Tapscott SJ, Vasioukhin V. Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice. *Genes Dev* 2004; 18:559-71; PMID:15037549; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1178004>
68. Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 1987; 120:215-27; PMID:3817290; [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90119-9](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(87)90119-9)
69. Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol Cell Neurosci* 1998; 11:183-93; PMID:9675050; <http://dx.doi.org/10.1006/mcne.1998.0680>
70. Gänzler-Odenthal SI, Redies C. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J Neurosci* 1998; 18:5415-25; PMID:9651223
71. Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 2007; 18:2305-12; PMID:17429076; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-01-0073>
72. Abouhamed M, Grobe K, San IVLC, Thelen S, Honnert U, Balda MS, Matter K, Bähler M. Myosin IXa regulates epithelial differentiation and its deficiency results in hydrocephalus. *Mol Biol Cell* 2009; 20:5074-85; PMID:19828736; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0291>
73. Roales-Buján R, Páez P, Guerra M, Rodríguez S, Vio K, Ho-Plagaró A, García-Bonilla M, Rodríguez-Pérez L-M, Domínguez-Pinos M-D, Rodríguez E-M, et al. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 2012; 124:531-46; PMID:22576081; <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-012-0992-6>
74. Oliver C, González CA, Alvial G, Flores CA, Rodríguez EM, Bätz LF. Disruption of CDH2/N-cadherin-based adherens junctions leads to apoptosis of ependymal cells and denudation of brain ventricular walls. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72:846-60; PMID:23965744; <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182a2d5fe>
75. Shim JW, Sandlund J, Han CH, Hameed MQ, Connors S, Klagsbrun M, Madsen JR, Irwin N. VEGF, which is elevated in the CSF of patients with hydrocephalus, causes ventriculomegaly and ependymal changes in rats. *Exp Neurol* 2013; 247:703-9; PMID:23518418; <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.011>
76. Chae TH, Kim S, Marz KE, Hanson PI, Walsh CA. The hyh mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 2004; 36:264-70; PMID:14758363; <http://dx.doi.org/10.1038/ng1302>
77. Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez P, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:1105-19; PMID:11706940
78. Páez P, Bätz L-F, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez L-M, Rodríguez S, Jiménez AJ, Rodríguez EM, Pérez-Figares JM. Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66:1082-92; PMID:18090917; <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e31815c1952>
79. Bätz LF, Roales-Buján R, Rodríguez-Pérez LM, Matas IM, Páez P, Roque M, Jiménez AJ, Ramos C, Pérez-Figares JM. A simple PCR-based genotyping method for M105I mutation of alpha-SNAP enhances the study of early pathological changes in hyh phenotype. *Mol Cell Probes* 2009; 23:281-90; PMID:19615440; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2009.07.002>
80. Wagner C, Batiz LF, Rodríguez S, Jiménez AJ, Páez P, Tomé M, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62:1019-40; PMID:1457238
81. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez A-J, Weil B, Arráz M-A, Pérez-Figares J-M, Rodríguez E-M. Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64:595-604; PMID:16042311; <http://dx.doi.org/10.1097/01.jnen.0000171648.86718.bb>
82. de Wit OA, den Dunnen WF, Sollie KM, Muñoz RI, Meiners LC, Brouwer OF, Rodríguez EM, Sival DA. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningomyelocele. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008; 5:4; PMID:18312688; <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8454-5-4>
83. Cherian SS, Love S, Silver IA, Porter HJ, Whitelaw AGL, Thoresen M. Posthemorrhagic ventricular dilatation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62:292-303; PMID:12638733
84. Yung YC, Mutoh T, Lin M-E, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, Kingsbury MA, Chun J. Lysophosphatidic Acid Signaling May Initiate Fetal Hydrocephalus. *Sci Transl Med* 2011; 3:99ra87-99ra87.
85. Ferland RJ, Batiz LF, Neal J, Lian G, Bundock E, Lu J, Hsiao Y-C, Diamond R, Mei D, Banham AH, et al. Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum Mol Genet* 2009; 18:497-516; PMID:18996916; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn377>
86. Zhou FC, Sari Y, Powrozek T, Goodlett CR, Li T-K. Moderate alcohol exposure compromises neural tube midline development in prenatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 144:43-55; PMID:12888216; [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00158-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00158-5)
87. Sakata-Haga H, Sawada K, Ohnishi T, Fukui Y. Hydrocephalus following prenatal exposure to ethanol. *Acta Neuropathol* 2004; 108:393-8; PMID:15365720; <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-004-0901-8>
88. Brightman MW, Palay SL. THE FINE STRUCTURE OF EPENDYMA IN THE BRAIN OF THE RAT. *J Cell Biol* 1963; 19:415-39; PMID:14086765; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.19.2.415>
89. Nelson DJ, Wright EM. The distribution, activity, and function of the cilia in the frog brain. *J Physiol* 1974; 243:63-78; PMID:4375184
90. Murcia CL, Woychik RP. Expression of Pcdh15 in the inner ear, nervous system and various epithelia of the developing embryo. *Mech Dev* 2001; 105:163-6; PMID:11429292; [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00388-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00388-4)
91. Hirano S, Wang X, Suzuki ST. Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 98:119-23; PMID:11834302; [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00317-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00317-5)
92. Bouillé C, Mesnil M, Barriere H, Gabrion J. Gap junctional intercellular communication between cultured ependymal cells, revealed by lucifer yellow CH transfer and freeze-fracture. *Glia* 1991; 4:25-36; PMID:1828784; <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440040104>
93. Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudò G, Mirone MB, Belluardo N. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* 2003; 18:1807-27; PMID:14622215; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02910.x>
94. Söhl G, Odermatt B, Maxeiner S, Degen J, Willecke K. New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47:245-59; PMID:15572175; <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.006>
95. Yamamoto T, Kardami E, Nagy JI. Basic fibroblast growth factor in rat brain: localization to glial gap junctions correlates with connexin43 distribution. *Brain Res* 1991; 554:336-43; PMID:1657293; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90213-F](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90213-F)

96. Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, Bell PD, Schwiebert EM, Yoder BK. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 2005; 132:5329-39; PMID:16284123; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02153>
97. Jarvis CR, Andrew RD. Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* 1988; 8:3691-702; PMID:3193176
98. Guerra M, Blázquez JL, Peruzzo B, Peláez B, Rodríguez S, Toranzo D, Pastor F, Rodríguez EM. Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes. *Cell Tissue Res* 2010; 339:359-81; PMID:19937347; <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-009-0885-8>
99. Rash JE, Duffy HS, Dudek FE, Bilhartz BL, Whalen LR, Yasumura T. Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol* 1997; 388:265-92; PMID:9368841; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971117\)388:2<265::AID-CNE6>3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971117)388:2<265::AID-CNE6>3.0.CO;2-#)
100. Li Y-C, Bai W-Z, Hashikawa T. Regionally varying F-actin network in the apical cytoplasm of ependymocytes. *Neurosci Res* 2007; 57:522-30; PMID:17239462; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2006.12.009>
101. Lippoldt A, Jansson A, Kniessel U, Andbjør B, Andersson A, Wolburg H, Fuxe K, Haller H. Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Res* 2000; 854:197-206; PMID:10784122; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02355-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02355-0)
102. Alvarez JI, Teale JM. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 2007; 187:102-13; PMID:17597230; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.05.005>
103. Johanson C, Stopa E, McMillan P, Roth D, Funk J, Krinke G. The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. *Toxicol Pathol* 2011; 39:186-212; PMID:21189316; <http://dx.doi.org/10.1177/0192623310394214>
104. Zhang J, Liss M, Wolburg H, Blasig IE, Abdelilah-Seyfried S. Involvement of claudins in zebrafish brain ventricle morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1257:193-8; PMID:22671606; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06507.x>
105. Cifuentes M, Fernández-Llebrez P, Pérez J, Pérez-Figares JM, Rodríguez EM. Distribution of intraventricularly injected horseradish peroxidase in cerebrospinal fluid compartments of the rat spinal cord. *Cell Tissue Res* 1992; 270:485-94; PMID:1486601; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00645050>
106. Nicholson C. Signals that go with the flow. *Trends Neurosci* 1999; 22:143-5; PMID:10203848; [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01388-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01388-5)
107. Ghersi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience* 1996; 75:1271-88; PMID:8938759; [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00281-3](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(96)00281-3)
108. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, Herkenham M. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience* 2000; 95:577-92; PMID:10658638; [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00417-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00417-0)
109. Kuchler S, Graff MN, Gobaille S, Vincendon G, Roche AC, Delaunoy JP, Monsigny M, Zanetta JP. Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. *Neurochem Int* 1994; 24:43-55; PMID:8130735; [http://dx.doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90128-7](http://dx.doi.org/10.1016/0197-0186(94)90128-7)
110. Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* 2013; 521:3389-405; PMID:23649873; <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23355>
111. Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E. Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *Am J Physiol* 1980; 238:F42-9; PMID:7356021
112. Wagshul ME, Eide PK, Madsen JR. The pulsating brain: A review of experimental and clinical studies of intracranial pulsatility. *Fluids Barriers CNS* 2011; 8:5; PMID:21349153; <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-8-5>
113. Sweetman B, Linninger AA. Cerebrospinal fluid flow dynamics in the central nervous system. *Ann Biomed Eng* 2011; 39:484-96; PMID:20737291; <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-010-0141-0>
114. Yamada S, Miyazaki M, Kanazawa H, Higashi M, Morohoshi Y, Bluml S, McComb JG. Visualization of cerebrospinal fluid movement with spin labeling at MR imaging: preliminary results in normal and pathophysiologic conditions. *Radiology* 2008; 249:644-52; PMID:18936318; <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2492071985>
115. Nguyen T, Chin WC, O'Brien JA, Verdugo P, Berger AJ. Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. *J Physiol* 2001; 531:131-40; PMID:11179397; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0131j.x>
116. Aghajanian GK, Gallager DW. Raphe origin of serotonergic nerves terminating in the cerebral ventricles. *Brain Res* 1975; 88:221-31; PMID:167906; [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90386-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(75)90386-8)
117. Mönkkönen KS, Hirst RA, Laitinen JT, O'Callaghan C. PACAP27 regulates ciliary function in primary cultures of rat brain ependymal cells. *Neuropeptides* 2008; 42:633-40; PMID:18986701; <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2008.09.006>
118. Conductier G, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovère C, et al. Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. *Nat Neurosci* 2013; 16:845-7; PMID:23708141; <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3401>
119. Tomé M, Moreira E, Pérez-Figares J-M, Jiménez AJ. Presence of D1- and D2-like dopamine receptors in the rat, mouse and bovine multiciliated ependyma. *J Neural Transm* 2007; 114:983-94; PMID:17458496; <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-007-0666-z>
120. Davy BE, Robinson ML. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1163-70; PMID:12719380; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg122>
121. Baas D, Meinel A, Benadiba C, Bonnafé E, Meinel O, Reith W, Durand B. A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 2006; 24:1020-30; PMID:16930429; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05002.x>
122. Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen U-P, North A, Heintz N, Omran H. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2133-41; PMID:15269178; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddh219>
123. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, García-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JLR, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 2006; 311:629-32; PMID:16410488; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1119133>
124. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 1997; 175:137-240; PMID:9203358; [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62127-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62127-0)
125. Cifuentes M, Rodríguez S, Pérez J, Grondona JM, Rodríguez EM, Fernández-Llebrez P. Decreased cerebrospinal fluid flow through the central canal of the spinal cord of rats immunologically deprived of Reissner's fiber. *Exp Brain Res* 1994; 98:431-40; PMID:8056065; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00233981>
126. Grondona JM, Pérez-Martín M, Cifuentes M, Pérez J, Estivill-Torrús G, Pérez-Figares JM, Fernández-Llebrez P, Rodríguez EM. Neuraminidase injected into the cerebrospinal fluid impairs the assembly of the glycoproteins secreted by the subcommissural organ preventing the formation of Reissner's fiber. *Histochem Cell Biol* 1998; 109:391-8; PMID:9562389; <http://dx.doi.org/10.1007/s004180050240>
127. Picketts DJ. Neuropeptide signaling and hydrocephalus: SCO with the flow. *J Clin Invest* 2006; 116:1828-32; PMID:16823482; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI29148>
128. Rodríguez EM, Oksche A, Montecinos H. Human subcommissural organ, with particular emphasis on its secretory activity during the fetal life. *Microsc Res Tech* 2001; 52:573-90; PMID:11241867; [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<573::AID-JEMT1042>3.0.CO;2-6)
129. Grondona JM, Pérez-Martín M, Cifuentes M, Pérez J, Jiménez AJ, Pérez-Figares JM, Fernández-Llebrez P. Ependymal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neuraminidase into the lateral ventricle of adult rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:999-1008; PMID:8800096; <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199609000-00007>
130. Cioffi DL, Pandey S, Alvarez DF, Cioffi EA. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302:L1067-77; PMID:22387293; <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00190.2011>
131. Meinel A. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:463-8; PMID:17150405; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.10.021>
132. Castañeyra-Perdomo A, Meyer G, Carmona-Calero E, Bañuelos-Pineda J, Méndez-Medina R, Ormazabal-Ramos C, Ferrer-Torres R. Alterations of the subcommissural organ in the hydrocephalic human fetal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 79:316-20; PMID:7955332; [http://dx.doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90138-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-3806(94)90138-4)
133. Overholser MD, Whitley JR, O'Dell BL, Hogan AG. The ventricular system in hydrocephalic rat brains produced by a deficiency of vitamin B12 or of folic acid in the maternal diet. *Anat Rec* 1954; 120:917-33; PMID:14350261; <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091200407>
134. Zhang D, Zeldin DC, Blackshear PJ. Regulatory factor X4 variant 3: a transcription factor involved in brain development and disease. *J Neurosci Res* 2007; 85:3515-22; PMID:17510980; <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21356>

135. Lang B, Song B, Davidson W, MacKenzie A, Smith N, McCaig CD, Harmar AJ, Shen S. Expression of the human PAC1 receptor leads to dose-dependent hydrocephalus-related abnormalities in mice. *J Clin Invest* 2006; 116:1924-34; PMID:16823490; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI27597>
136. Dietrich P, Shanmugasundaram R, Shuyu E, Dragatsis I. Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages. *Hum Mol Genet* 2009; 18:142-50; PMID:18838463; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn324>
137. Fernández-Llebrez P, Grondona JM, Pérez J, López-Aranda MF, Estivill-Torrús G, Llebrez-Zayas PF, Soriano E, Ramos C, Lallemand Y, Bach A, et al. Mx1-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63:574-86; PMID:15217086
138. Vio K, Rodríguez S, Navarrete EH, Pérez-Figares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM. Hydrocephalus induced by immunological blockage of the subcommissural organ-Reissner's fiber (RF) complex by maternal transfer of anti-RF antibodies. *Exp Brain Res* 2000; 135:41-52; PMID:11104126; <http://dx.doi.org/10.1007/s002210000474>
139. Orloff AR, Vio K, Guerra M, Jaramillo K, Kaehne T, Jones H, McAllister JP 2nd, Rodríguez E. Role of the subcommissural organ in the pathogenesis of congenital hydrocephalus in the HTx rat. *Cell Tissue Res* 2013; 352:707-25; PMID:23640132; <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1615-9>
140. Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Möllgård K, Potter A, Schuliga M, Saunders NR. Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. *Cell Tissue Res* 2005; 322:353-64; PMID:16133142; <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-1120-x>
141. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008; 5:10; PMID:18479516; <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8454-5-10>
142. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J* 2005; 19:76-8; PMID:15533949
143. Owlser BK, Pitham T, Wang D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7:15; PMID:20860832
144. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; 63:321-36; PMID:11115728; [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00035-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00035-6)
145. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 1997; 17:171-80; PMID:8987746
146. Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience* 2004; 129:947-55; PMID:15561410; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.022>
147. Yukutake Y, Yasui M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience* 2010; 168:885-91; PMID:19850109; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.029>
148. Yool AJ. Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist* 2007; 13:470-85; PMID:17901256; <http://dx.doi.org/10.1177/1073858407303081>
149. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:991-1001; PMID:14682361; <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1252>
150. Shen XQ, Miyajima M, Ogino I, Arai H. Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *J Neurosurg* 2006; 105(Suppl):459-64; PMID:17184078
151. Feng X, Papadopoulos MC, Liu J, Li L, Zhang D, Zhang H, Verkman AS, Ma T. Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *J Neurosci Res* 2009; 87:1150-5; PMID:18951529; <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21927>
152. Li X, Kong H, Wu W, Xiao M, Sun X, Hu G. Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience* 2009; 162:67-77; PMID:19393298; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.044>
153. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14:265-77; PMID:23481483; <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3468>
154. Mao X, Enno TL, Del Bigio MR. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* 2006; 23:2929-36; PMID:16819982; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04829.x>
155. Tourdias T, Dragonu I, Fushimi Y, Deloire MSA, Boiziau C, Brochet B, Moonen C, Petry KG, Doussat V. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study. *Neuroimage* 2009; 47:659-66; PMID:19409501; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.04.070>
156. Bloch O, Auguste KI, Manley GT, Verkman AS. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26:1527-37; PMID:16552421; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600306>
157. Skjolding AD, Holst AV, Broholm H, Laursen H, Juhler M. Differences in distribution and regulation of astrocytic aquaporin-4 in human and rat hydrocephalic brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; PMID:22497211
158. Mishra PK, Teale JM. Transcriptome analysis of the ependymal barrier during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2012; 9:141; PMID:22731103; <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-141>
159. Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiesler OD, Lassmann H. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53:457-68; PMID:7521903; <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199409000-00005>
160. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 2006; 8:156-62; PMID:16429129; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1355>
161. Deren KE, Packer M, Forsyth J, Milash B, Abdullah OM, Hsu EW, McAllister JP 2nd. Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 2010; 226:110-9; PMID:20713048; <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.010>
162. Olopade FE, Shokunbi MT, Sirén A-L. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9:19; PMID:22938200; <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-9-19>
163. Miller JM, McAllister JP 2nd. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2007; 4:5; PMID:17555588; <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8454-4-5>
164. Eskandari R, Harris CA, McAllister JP 2nd. Reactive astrocytosis in feline neonatal hydrocephalus: acute, chronic, and shunt-induced changes. *Childs Nerv Syst* 2011; 27:2067-76; PMID:21847645; <http://dx.doi.org/10.1007/s00381-011-1552-4>

ORIGINAL ARTICLE

Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis

María Montserrat Guerra, PhD, Roberto Henzi, PhD, Alexander Ortloff, PhD, Nicole Lichtin, PhD, Karin Vío, PhD, Antonio J. Jiménez, PhD, María Dolores Dominguez-Pinos, MD, César González, PhD, María Clara Jara, Fernando Hinojosa, PhD, Sara Rodríguez, PhD, Maryoris Jara, MSc, Eduardo Ortega, MD, Francisco Guerra, MD, Deborah A. Sival, MD, Wilfred F. A. den Dunnen, MD, José M. Pérez-Figares, PhD, James P. McAllister, PhD, Conrad E. Johanson, PhD, and Esteban M. Rodríguez, MD, PhD

Abstract

Fetal-onset hydrocephalus affects 1 to 3 per 1,000 live births. It is not only a disorder of cerebrospinal fluid dynamics but also a brain disorder that corrective surgery does not ameliorate. We hypothesized that cell junction abnormalities of neural stem cells (NSCs) lead to the inseparable phenomena of fetal-onset hydrocephalus and abnormal neurogenesis. We used bromodeoxyuridine labeling, immunocytochemistry, electron microscopy, and cell culture to study the telencephalon of hydrocephalic HTx rats and correlated our findings with those in human hydrocephalic and nonhydrocephalic human fetal brains (n = 12 each). Our results suggest that abnormal expression of the intercellular junction proteins N-cadherin and connexin-43 in NSC leads to 1) disruption of the ventricular and subventricular zones, loss of NSCs and neural progenitor cells; and 2) abnormalities in neurogenesis such as periventricular heterotopias and abnormal neuroblast migration. In HTx rats, the disrupted NSC and progenitor cells are shed into the cerebrospinal fluid and can be grown into neurospheres that display intercellular junction abnormalities similar to those of NSC of the disrupted ventricular zone; nevertheless,

they maintain their potential for differentiating into neurons and glia. These NSCs can be used to investigate cellular and molecular mechanisms underlying this condition, thereby opening the avenue for stem cell therapy.

Key Words: Cerebrospinal fluid, Congenital hydrocephalus, HTx rat, Human, Junction pathology, Neural stem cells, Neurospheres, Ventricular zone disruption.

INTRODUCTION

Fetal-onset hydrocephalus is heterogeneous. Genetic mutations, such as X-linked hydrocephalus (1), distal neural tube defects, namely, spina bifida (2), and environmental factors, such as nutritional deficiencies (3), viral infection of ependyma (4), and prematurity-related intraventricular hemorrhage (5), contribute to its occurrence. Congenital hydrocephalus affects 1 to 3 of 1,000 live births and is characterized by abnormal cerebrospinal fluid (CSF) flow that results in ventricular dilatation (6). Surgical diversion of CSF (shunting) does not resolve most aspects of this disease (7). Indeed, 80% to 90% of the neurologic impairments suffered by shunt-dependent neonates with fetal-onset hydrocephalus are not reversed by surgery. How then can we explain the inborn and, so far, irreparable neurologic impairment of children born with hydrocephalus? Recent studies have begun to identify cellular pathogenesis that accompanies fetal-onset hydrocephalus (2, 8–11), but the nature, mechanism, and extent of the brain impairment linked to congenital hydrocephalus are not understood.

Most cells of the developing mammalian brain derive from the ventricular zone (VZ) and subventricular zone (SVZ), which are formed by the radial glia/neural stem cells (NSCs) and neural progenitor cells (NPCs), respectively (12–14). A large body of evidence obtained from several mutant animals and some human cases of fetal-onset hydrocephalus indicates that the disruption of the VZ of the cerebral aqueduct is associated with the onset of hydrocephalus (15–19). The disruption process starts early in fetal life and finishes during the first postnatal weeks, affecting equally the NSCs and the ependymal cells forming the VZ at prenatal and postnatal stages of development (9, 16–19).

From the Instituto de Anatomía, Histología y Patología (MMG, RH, AO, NL, KV, CG, MCJ, FH, SR, MJ, EMR), Instituto de Neurociencias Clínicas (EO), Instituto de Obstetricia y Ginecología (FG), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; Facultad de Recursos Naturales (AO), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Araucanía, Chile; Departments of Pediatric Neurology and Pediatrics (DAS), and Pathology and Medical Biology (WFAdD), University Medical Center, University of Groningen, Groningen, The Netherlands; Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain (AJJ, MDD-P, JMP-F); Department of Neurosurgery, Pediatric Neurosurgery Division, University of Utah, Salt Lake City, Utah (JPMA); and Department of Neurosurgery, Alpert Medical School at Brown University, Providence, Rhode Island (CEJ).

María Montserrat Guerra and Roberto Henzi contributed equally to this work. Send correspondence and reprint requests to: María Montserrat Guerra, PhD, Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; E-mail: monserratguerra@uach.cl

This work was supported by Fondecyt (Chile) grants 1070241 and 1111018 to Esteban M. Rodríguez; Hydrocephalus Association Established Investigator Award (No. 51002705) to James P. McAllister, Esteban M. Rodríguez, and Conrad E. Johanson; Instituto de Salud Carlos III (Spain) grants PI12/0631 and FEDER and Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) (PCI2006-A/-0669) to Antonio J. Jiménez; and Universidad Austral de Chile/DID S-2006-72 to Karin Vío.

Although a disrupted VZ occurs in the telencephalon of hydrocephalic patients and mutant rodents (11, 17, 20), little is known about the mechanism of disruption and the outcomes. There is evidence that abnormalities of cell junctions involving adherent and gap junctions are implicated in VZ disruption (9, 16, 20–22). However, there are few reports on the role of adherent and gap junctions in the pathophysiology of abnormal neurogenesis in fetal-onset hydrocephalus (20, 23). We hypothesized that cell junction pathology of NSCs, involving abnormal expression of N-cadherin and connexin-43, leads to both hydrocephalus and abnormal neurogenesis. To test this hypothesis, we analyzed mutant HTx rats, which develop fetal-onset noncommunicating hydrocephalus, as well as human cases of fetal-onset hydrocephalus. The evidence obtained uniformly supports the hypothesis that a dislodging of intercellular N-cadherin and connexin-43 in NSCs is associated with VZ/SVZ disruption, formation of periventricular heterotopias (PHs), and displacement of NSCs into the CSF. Neurospheres experimentally formed from the displaced cells have characteristics similar to the disrupted zones in vivo and, therefore, may prove useful in further molecular analyses of congenital disorders such as PH and hydrocephalus.

MATERIALS AND METHODS

Human Brain Specimens

This study was performed on fetal specimens obtained from the University Hospital, Groningen, The Netherlands; the Pathology Department of Carlos Haya Hospital, Málaga,

Spain; and the Regional Hospital of Valdivia, Chile. The medical ethics committees of the 3 hospitals approved the study. The respective families had given informed consent. Twelve hydrocephalic and 12 control human fetuses, ranging between 16 and 40 gestational weeks (GWs), were investigated (Table). Histologic sections of the brainstem (cerebral aqueduct) of Cases 1 to 5 (Table) were used in a previous study (16). Cases 2 to 5 displayed major abnormalities compromising life expectancy; these included progressively devastating hydrocephalus with signs of incarceration (hampering delivery requiring cephalocentesis) and underdevelopment of lungs and heart. Control cases had no neuropathologic alterations. Four to 6 tissue blocks were obtained from each brain; they were serially cut, producing a series of several hundreds of 5- μ m-thick sections. For each series, every 20th section was mounted side by side, obtaining 20 semiseries per tissue block that were used for hematoxylin and eosin stain, immunocytochemistry, and double immunofluorescence analyses.

Animals

Rats of the HTx strain (7) were obtained from the laboratory of Dr Hazel Jones (University of Florida, Gainesville, FL) in 2002 and bred into a colony in the Animal Facility at the Instituto de Anatomía Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Housing, handling, care, and processing of animals were carried out according to regulations approved by the National Research Council of Chile (Conicyt). The ethics committees of Universidad Austral de Chile and the University of Utah approved the experimental

TABLE. Hydrocephalic and Control Human Fetuses

Case No./Diagnosis	Gestational Age, weeks	Delivery	Source	Fixation
1. SBA	21	Abruptio placentae	G	4% PF in PBS pH 7.4
2. SBA	22	Induced by PGE2	G	4% PF in PBS pH 7.4
3. SBA	37	Induced by PGE2	G	4% PF in PBS pH 7.4
4. SBA	39	Induced by PGE2	G	4% PF in PBS pH 7.4
5. SBA	40	Induced by PGE2	G	4% PF in PBS pH 7.4
6. Hy	30	Spontaneous abortion	M	5% formalin
7. Hy	31	Spontaneous abortion	M	5% formalin
8. Hy	34	Spontaneous abortion	M	5% formalin
9. SBA	20	Spontaneous abortion	M	5% formalin
10. SBA	22	Spontaneous abortion	M	5% formalin
11. SBA	36	Spontaneous abortion	M	5% formalin
12. Hy, Potter syndrome	40	Spontaneous abortion	M	5% formalin/Bouin
13. Control	22	Premature labor	G	4% PF in PBS pH 7.4
14. Control	33	Premature labor	G	4% PF in PBS pH 7.4
15. Control	37	Twin pregnancy cesarean section	G	4% PF in PBS pH 7.4
16. Control	41	Umbilical cord strangulation	G	4% PF in PBS pH 7.4
17. Control	16	Spontaneous abortion	M	5% formalin
18. Control	21	Spontaneous abortion	M	5% formalin
19. Control	30	Spontaneous abortion	M	5% formalin
20. Control	22	Spontaneous abortion	M	5% formalin
21. Control, Potter syndrome	21	Spontaneous abortion	M	5% formalin
22. Control	16	Spontaneous abortion	V	5% formalin
23. Control	21	Spontaneous abortion	V	5% formalin
24. Control	22	Spontaneous abortion	V	5% formalin

G, Groningen; Hy, isolated hydrocephalus; M, Málaga; PBS, phosphate buffered saline; PF, paraformaldehyde; PGE2, prostaglandin E2; SBA, spina bifida aperta; V, Valdivia.

Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016



protocol. The hydrocephalic phenotype was identified from an overtly domed head and by transillumination of the head of newborns. Definitive diagnosis was made by microscopic analysis of the brain, particularly the subcommissural organ, because, from E15 onward, the hydrocephalic HTx rats display a specific development defect in the subcommissural organ (24).

Tissue Processing for Light Microscopy

The following nonhydrocephalic (nHTx) and hydrocephalic (hyHTx) HTx rats were processed for immunocytochemistry: 1) Fetal Day 18 (E18, $n = 7$ nHTx, 8 hyHTx), E19 ($n = 2$ nHTx, 2 hyHTx), E20 ($n = 5$ nHTx, 5 hyHTx); Postnatal Day 1 (PN1, $n = 6$ nHTx, 10 hyHTx), PN5 ($n = 3$ nHTx, 4 hyHTx), PN7 ($n = 4$ nHTx, 4 hyHTx), PN21 ($n = 6$ nHTx, 6 hyHTx). Pregnant and newborn rats were anesthetized with ketamine (40 mg/kg) and acepromazine (100 mg/kg). Fetuses were dissected from the uterus, the head was removed, and a sagittal cut through the lateral region of the skull was performed to expose the lateral ventricle and the subarachnoid space to the fixative. Postnatally, brains were fixed by intravascular perfusion with Bouin fixative. The brains were then processed and embedded in paraffin. The telencephalon of each rat was cut serially at a thickness of 5 μm . Every 10th section of the series was mounted side by side, obtaining 10 semiseries of sections that were used for immunocytochemistry and immunofluorescence. In addition, the brains of 4 PN7 hyHTx rats were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, and the roof of the lateral ventricles was processed for whole-mount double immunofluorescence for N-cadherin/ β IV-tubulin and connexin-43/ β IV-tubulin.

Immunohistochemistry

Sections from human and HTx rat brains, and from neurospheres (see below), were processed for immunohistochemistry as described by Sternberger et al (25) or the streptavidin-biotin method (Vectastain kit; Vector, Serva, Heidelberg, Germany), with diaminobenzidine as chromogen. Antibodies against the following compounds were used: β IV-tubulin, monoclonal (Abcam, Cambridge, UK); CD99, monoclonal (Dako, Glostrup, Denmark); glial fibrillary acidic protein (GFAP), raised in rabbit (Sigma, St. Louis, MO); β III-tubulin, monoclonal (Sigma); nestin, monoclonal (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA); caveolin 1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA); N-cadherin raised in rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Inc); pan-cadherin (recognize all the types of cadherins; Sigma); connexin-43, raised in rabbit (gift from Dr Juan Carlos Sáez, Universidad Católica de Chile, Santiago, CL); bromodeoxyuridine (BrdU), monoclonal (Developmental Studies Hybridoma Bank). Antibodies were diluted in a buffer containing 0.1 mol/L Tris buffer, pH 7.8, 0.7% nongelling seaweed gelatin, lambda carrageenan, and 0.5% Triton X-100 (Sigma). Incubation was carried out for 18 hours at room temperature. Omission of the primary antibody during incubation provided the control for the immunoreactions.

Double Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Sections from neurospheres and human and HTx rat brains were processed for double immunofluorescence using

the following pairs of antibodies: anti-nestin/anti-caveolin 1; anti-caveolin 1/anti- β IV-tubulin; anti-N-cadherin/anti- β IV-tubulin; anti- β IV-tubulin/anti-connexin-43; anti-GFAP/anti- β III-tubulin; anti-nestin/anti-caveolin 1; anti-BrdU/anti- β III-tubulin; anti-BrdU/anti-GFAP; and anti-BrdU/anti- β IV-tubulin. Appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 or 594 (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA) were used. Slides were studied under an epifluorescence microscope using the multi-dimensional acquisition software AxioVision Rel (version 4.6) of Zeiss (Aalen, Germany) or a confocal microscope (Leica SP5 II) or by spectral confocal microscopy (Zeiss LSM780) with the 3D acquisition software Zen 2011, V8.0.

BrdU Labeling and Immunocytochemistry of CSF Cells

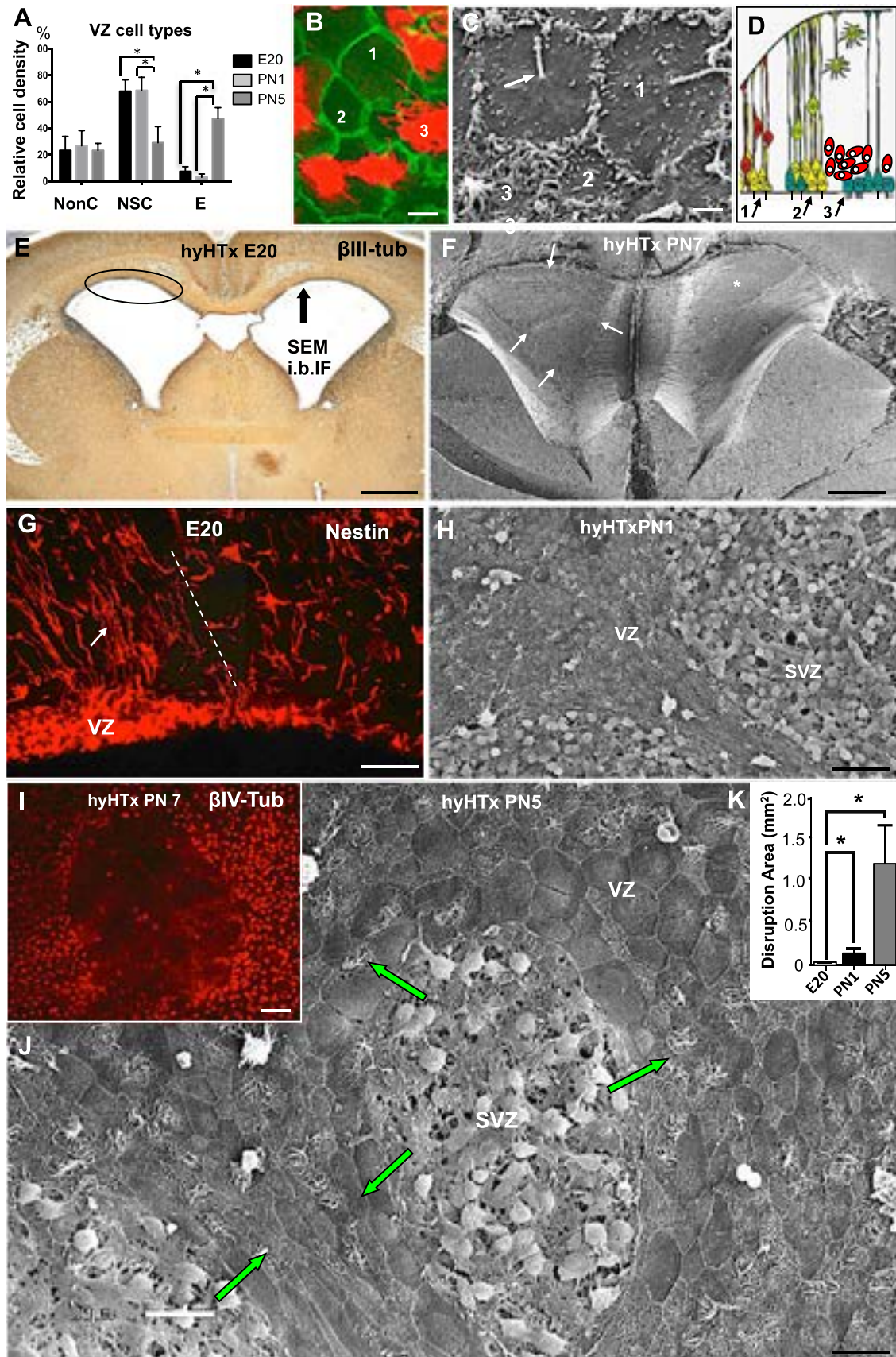
Postnatal Day 5 hyHTx rats ($n = 4$) were injected 3 times, at 1-hour intervals, with BrdU (Sigma; 100 mg/kg body weight) and killed 1 hour after the last injection. Brains were fixed by vascular perfusion with Bouin fixative. Tissue sections were processed for immunohistochemistry with anti-BrdU. The same BrdU protocol was applied to PN1 hyHTx rats ($n = 4$); 1 hour after the last injection, CSF samples from a lateral ventricle were centrifuged at $1,000 \times g$ for 1 minute. The resulting cell pellets were fixed in Bouin fluid and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were processed for anti-BrdU, anti- β III-tubulin, and anti-nestin immunocytochemistry.

BrdU Labeling and Immunocytochemistry of PH

Postnatal Day 7 ($n = 6$), PN21 ($n = 6$), and PN30 ($n = 4$) hyHTx rats were injected 3 times, at 1-hour intervals, with BrdU (Sigma; 100 mg/kg body weight) and killed 1 hour after the last injection. Brains were fixed by vascular perfusion with Bouin fixative. Tissue sections were processed for immunohistochemistry and double immunofluorescence using anti-BrdU and others antibodies.

Neurospheres From Brain Tissue

Postnatal Day 1 nHTx rats anesthetized with ketamine (40 mg/kg) and acepromazine (100 mg/kg) were killed by decapitation. The dorsolateral walls of both lateral ventricles containing the VZ/SVZ were excised under a microscope and placed in a 2-mL tube containing 1 mL of neurosphere culture medium (NeuroCult NS-A Proliferation Medium-Rat), supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor, and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin (StemCell Technologies, Vancouver, CA) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin/streptomycin (Sigma). The tissue was disaggregated mechanically and 1 mL of fresh culture medium was added. The cell suspension was centrifuged for 10 minutes at $110 \times g$; the resulting pellet was diluted (1:10) with culture medium and placed in a 12-well culture plate (TPP; Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). The cells were cultured for 6 days (DIV) and monitored by phase contrast microscopy; 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ BrdU was added for the last 24 hours of culture. Neurospheres were collected and spun down, and the resulting pellet was fixed in Bouin fixative and embedded in paraffin. This procedure was carried out 30 times. The same protocol was used to study neurospheres obtained from the VZ/SVZ of PN1 hyHTx rats. This experiment was performed 5 times.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016

Neurospheres From CSF

Unaffected and hydrocephalic HTx PN1 rats were used for CSF collection. Pups were anesthetized with ketamine (40 mg/kg) and acepromazine (100 mg/kg). Cerebrospinal fluid was obtained from the cisterna magna (15 μ L from each animal, nHTx) or from lateral ventricles (100 μ L) of hyHTx rats. Cerebrospinal fluid samples from 5 to 7 animals were pooled, centrifuged at 1,000 \times g for 30 seconds; the cells were then resuspended in culture medium and then plated in 1 well of a 12-well culture plate. The culture was maintained for 6 DIV and monitored by phase contrast microscopy; 10 μ mol/L BrdU was added for the last 24 hours of culture. In some experiments, neurospheres were cultured for 7 days. Neurospheres were collected and spun down, and the pellet was fixed in Bouin fixative and embedded in paraffin. This experiment was performed 14 times for CSF from hydrocephalic rats (hyCSF) and 6 times for CSF of nonaffected animals. No neurospheres were obtained from the CSF collected via the cisterna magna of normal rats.

Differentiation Assay

After 6 DIV, neurospheres grown from VZ/SVZ of nHTx and hyHTx rats were collected and plated in differentiation medium (NeuroCult NS-A Differentiation Medium-Rat, StemCell Technologies) on a poly-L-lysine-coated coverslip in a 12-well culture plate. The cultures were maintained for 2 to 3 weeks and monitored by microscopy. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and processed for double immunofluorescence analysis using anti- β III-tubulin/anti-GFAP.

Transmission Electron Microscopy

Brains from E20 (n = 3 nHTx, 5 hyHTx), PN1 (n = 5 nHTx, 8 hyHTx), and PN3 (n = 4 nHTx, 5 hyHTx) rats were fixed for 2 hours in a fixative of 4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde, and 2% acrolein in 0.2 mol/L phosphate buffer, pH 7.4 (26). A sagittal cut through the lateral region of the skull was made, and the fixative was gently subperfused into the exposed brain cavities. Blocks of tissue containing the roof of the lateral ventricles were postfixed in 1% OsO₄ in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, for 2 hours at 4°C.

Scanning Electron Microscopy

Brains from nHTx (n = 8) and hyHTx (n = 20) rats (E20, PN1, PN3, PN5, PN7, PN10) were processed for scanning electron microscopy (SEM). Fixation was in 1% paraformaldehyde

in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, for 2 hours. Tissue blocks were critical point dried, whereas neurospheres were dehydrated by a series of alcohols and acetone.

Data Analysis

Seventy-two electron micrographs obtained with the scanning electron microscope were used for image analyses to quantify the 1) area size of disrupted VZ of the telencephalon at E20, PN1, PN5 manually traced with NIH ImageJ and tabulated. Normality of data distribution was tested with D'Agostino-Pearson omnibus test. Data were expressed as average \pm SE with $p \leq 0.05$. 2) The relative cell density of NSCs, ependymal cells, and nonciliated cells of the pallium of E20, PN1, and PN5. Ordinary one-way analysis of variance with a Bonferroni multiple comparison test was applied. Data were expressed as average \pm SE with $p \leq 0.05$. Statistical analysis of data was made using Prism GraphPad 6.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA).

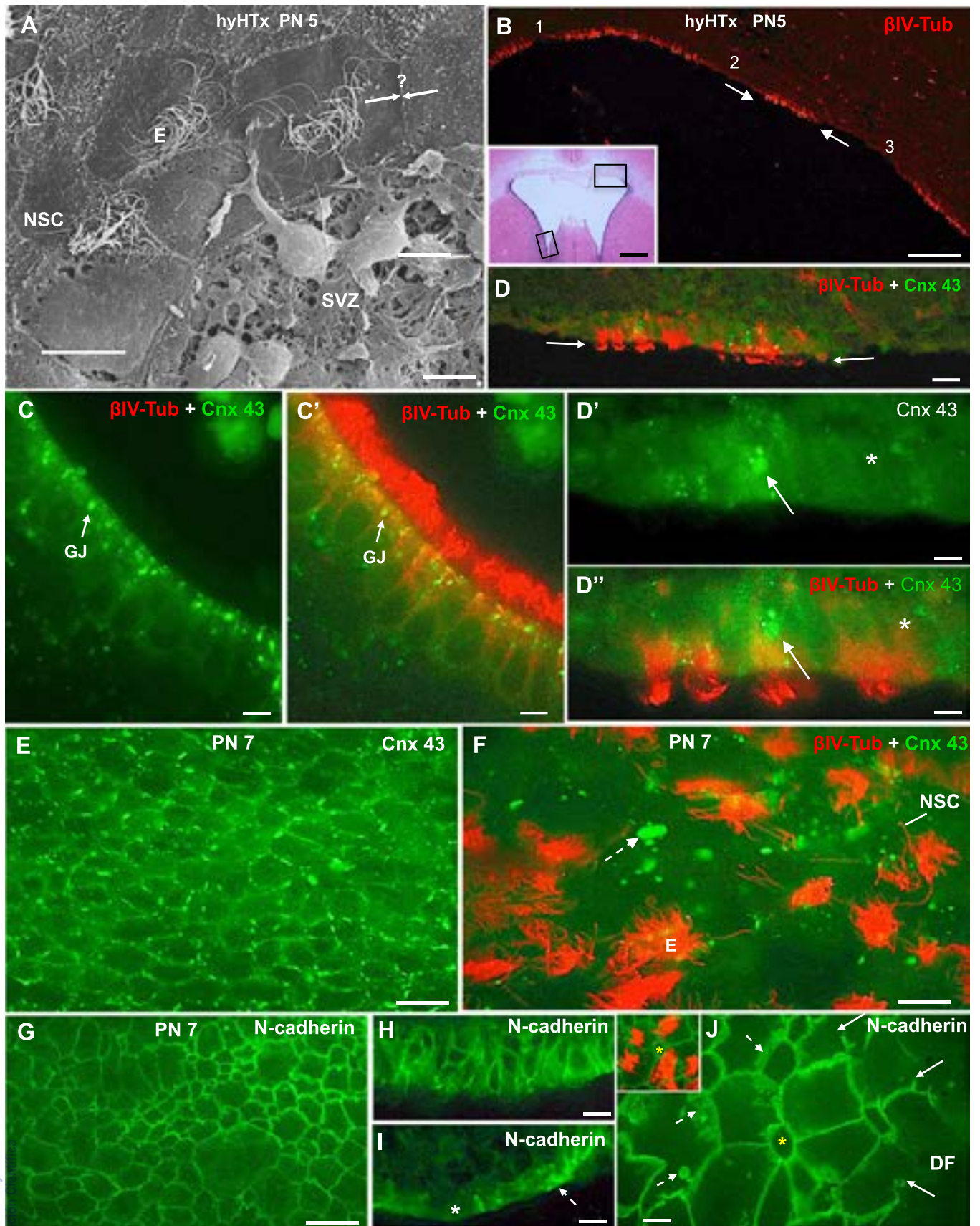
RESULTS

There is evidence that VZ disruption at the cerebral aqueduct is associated with the onset of hydrocephalus (16–19). The following findings obtained in the HTx rat model and in humans developing fetal-onset hydrocephalus suggest that the process of VZ disruption also reaches the telencephalon, resulting in abnormalities of neurogenesis.

The VZ of the HTx Telencephalon Displays a Temporospacial Pattern of Differentiation

There were distinct developmental differences between the medial and the laterodorsal walls of the lateral ventricles of HTx. Thus, from E20 onward, the VZ of the medial wall was formed by multiciliated ependymal cells whereas the VZ of the lateral and dorsal walls was formed by 3 cell types readily visualized with SEM and immunocytochemistry: 1) NSCs that were nestin positive and displayed a single cilium (Fig. 1B, C, D, G); 2) nonciliated cells that were distinguishable in whole-mount immunostaining for β IV-tubulin and N-cadherin and with SEM (Fig. 1B, C); and 3) multiciliated ependymal cells that were nestin-, caveolin 1-, and β IV-tubulin positive (Fig. 1B, C, I, J). At E20 and PN1, the VZ was formed by NSCs (~70%), nonciliated cells (~23%), and multiciliated cells (~7%). From PN1 onward, there were increasing numbers

FIGURE 1. In the hyHTx rat, disruption of the ventricular zone (VZ) starts during fetal life and continues during early postnatal life, resulting in the loss of neural stem cells (NSCs) and ependymal cells. The VZ is formed by 3 cell types: nonciliated cells, NSCs, and multiciliated ependymal cells. **(A)** Quantification of the 3 cell types at E20, PN1, and PN5. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.005$. **(B, C)** The 3 cell types are revealed by en bloc double immunolabeling for N-cadherin (green) and β IV-tubulin (red) **(B)** and scanning electron microscopy (SEM) **(C)**. **(D)** Drawing depicting the 3 cell types of the VZ. **(E)** Section of the brain of a hydrocephalic E20 fetus. The disrupted VZ of the pallium (encircled) is shown in the following figures. The arrow points to the surface views using SEM and en bloc immunofluorescence (i.b.IF). **(F)** PN7 hydrocephalic HTx. Scanning electron micrograph of the roof of lateral ventricles. Most of the VZ of the pallium is disrupted (arrows in the left ventricle; asterisk in the right ventricle). **(G)** Immunostaining for nestin reveals NSCs (arrow); NSCs are missing at zones of disruption, and the subventricular zone (SVZ) is disorganized (broken line). **(H, J)** Disruption starts at different foci and progresses radially (green arrows). **(I)** Pallium of a hyHTx rat stained en bloc for β IV-tubulin displaying a focus of disruption where ependymal cells are missing. **(K)** Quantification of the area of VZ disruption in hyHTx rats. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$. Scale bars = **(B)** 3 μ m; **(C)** 1.7 μ m; **(E)** 1,000 μ m; **(F)** 800 μ m; **(G)** 65 μ m; **(H)** 30 μ m; **(I)** 25 μ m; **(J)** 18 μ m.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016



of multiciliated ependymal cells and a decreasing number of NSCs (Fig. 1A). Interestingly, the relative number of non-ciliated cells remained approximately 20% during the periods studied. The possibility that they correspond to newborn NSCs not yet producing a cilium awaits investigation.

The VZ of the hyHTx Rat Telencephalon Undergoes Patterned Disruption

From E18 to PN7 hyHTx, disruption of the VZ consistently occurred in the dorsal wall of the lateral ventricles (pallium), rarely in the lateral wall, and never in the medial wall lined by multiciliated ependymal cells (Fig. 1E, F). Quantification of the denuded VZ area shows the progression of disruption from E19 to the end of the first postnatal weeks (Fig. 1K). Between PN7 and PN10, most of the VZ of the pallium had disrupted (Fig. 1F). During the first half of this 10-day period of disruption, most disrupted cells corresponded to NSC (Fig. 1A, G, H) whereas, during the second half, most disrupted cells were ependymal cells (Fig. 1A, I, J). The collective methodology, including CSF cell sampling, suggested the following sequence of events in disruption: phase 1, disruption starts as small foci where the VZ cells are missing and the NPCs of the SVZ protrude into the ventricle (Figs. 1J; 2A); phase 2, the disruption foci expand radially as the cells at the border (NSC or ependyma, depending on developmental stage) become denuded (Figs. 1H, J; 2A); and phase 3, expanding foci of disruption fuse and form large denuded areas (Fig. 1H, I).

The radial pattern of disruption makes HTx rats ideal to investigate the pathology of the VZ cells nearing disruption. The NSCs and ependyma have distinct phenotypes and certainly play different roles (6, 22). What do they have in common so that the disruption process will strike both cell types? We focused our attention on the expression of junction proteins in the VZ cells to understand this devastation.

Disrupted NSCs/Ependyma in hyHTx Rats Display Abnormal Expression of Junction Proteins

The VZ cells located at the disruption front of each denudation focus were the targets for analyzing the pathology

leading to their injury (Fig. 2A, B). The cells bordering the disruption foci, soon to be detached, either accumulated connexin-43 and N-cadherin as large masses in the cytoplasm (arrow in Fig. 2D', D'', F; broken arrow in Fig. 2I, J) or were devoid of these proteins (asterisks in the same figures). By contrast, the VZ of the lateral walls of the lateral ventricles did not disrupt, even under extreme ventricular expansion (Fig. 2B inset). In these latter cells, used as an internal control, similar to those of the VZ of nHTx, connexin-43 and N-cadherin localized at the apical region of the lateral plasma membrane (honeycomb appearance), most likely corresponding to gap and adherens junctions, respectively (Fig. 2C, C', E, G, H).

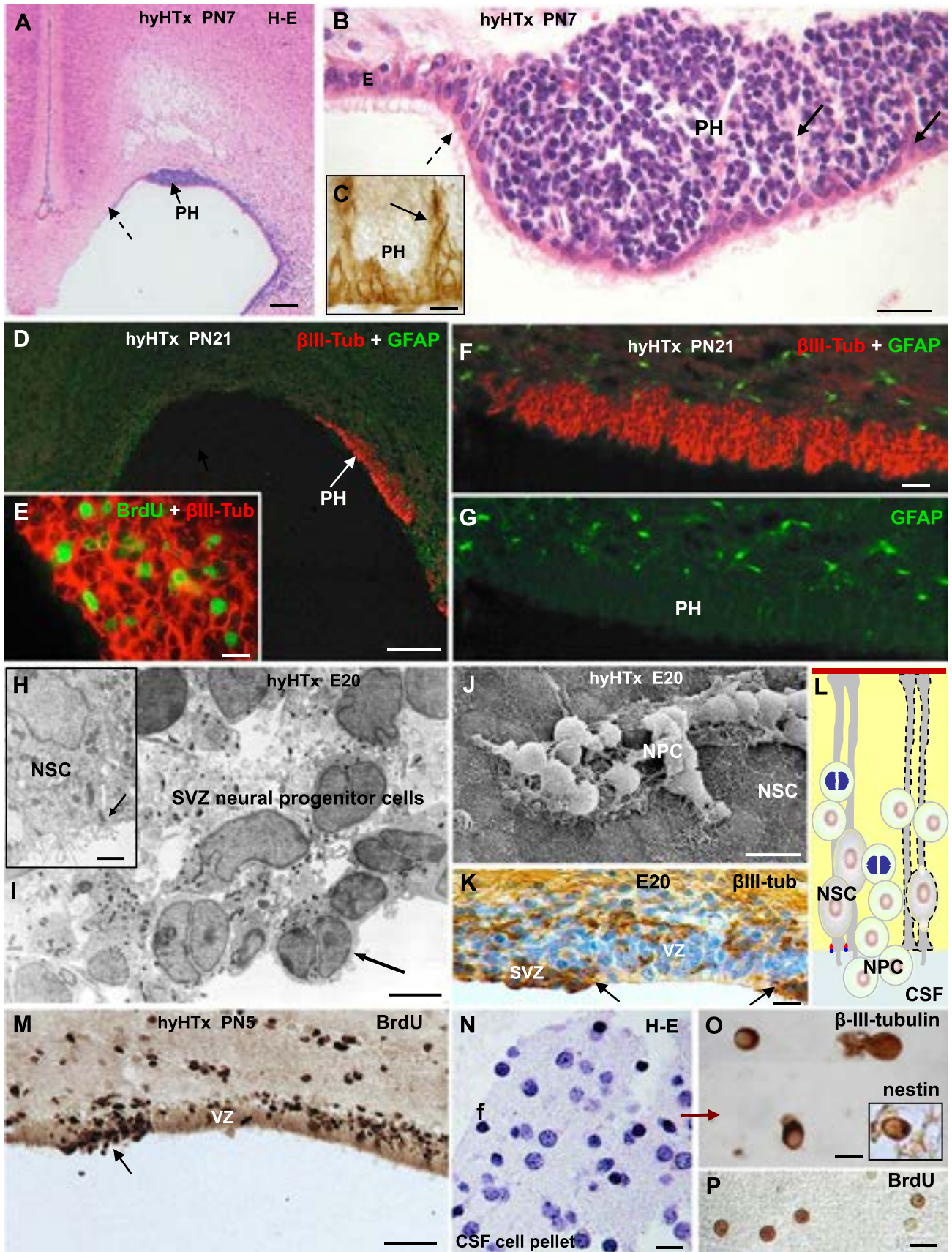
VZ Disruption Leads to PH

From PN7 on, when rat corticogenesis has been completed and the VZ is mainly formed by multiciliated ependyma, PHs were consistently found in hyHTx rats (Fig. 3A–G). They were located at the roof of both lateral ventricles, at the sites where VZ disruption had taken place during the perinatal period (Figs. 1 F, G, E; 3A).

The cells forming PHs were either exposed to the ventricular cavity (Fig. 3D–F) or were partially or completely lined by a cell layer formed by GFAP-positive cells, ependymal cells, and a few cells with a long basal process (Fig. 3B). These processes arranged into bundles that divided PHs into compartments (Fig. 3B). This arrangement became more evident by tomato lectin binding that selectively labels the plasma membrane of NSCs (Fig. 3C). Periventricular heterotopias were formed by densely packed spherical cells, approximately 7 μm in diameter, displaying a large and strongly basophilic nucleus and a ring of cytoplasm (Fig. 3B).

At PN21, PHs became readily distinguishable (Fig. 3D–G). Virtually all cells forming PHs were βIII-tubulin positive and GFAP negative (Fig. 3F, G). Beta-III-tubulin-positive cells ranged in shape from spherical to small multipolar cells (Fig. 3E, F). After a cumulative dose of BrdU administered for 3 days, only 30% of the βIII-tubulin-positive cells of PHs displayed a labeled nucleus (Fig. 3E). By contrast, 80% to 90% of βIII-tubulin-positive cells of the postnatal neurogenesis SVZ were labeled with BrdU.

FIGURE 2. In hyHTx rats, the cells of the ventricular zone (VZ) close to become disrupted have abnormal connexin-43 and N-cadherin expression. **(A)** Scanning electron microscopy. Ependymal cells [E] and neural stem cells (NSCs) at the disruption borders were targeted for study of abnormalities of junction complexes (mirror arrows). **(B)** Disruption foci [1–3] are shown. Arrows point to disruption fronts approaching each other. For orientation, see the top rectangle of the insert. **(C, C')** One- and 2-channel views to show connexin-43 (Cnx 43, green) and βIV-tubulin (βIV-tub, red) in an area not affected by disruption (for orientation, see bottom rectangle in inset of **B**); connexin-43 was confined to the plasma membrane forming gap junctions (GJ). **(D)** Two disruption fronts approaching each other (arrows). **(D, D')** Detailed magnification of previous figure visualized with 1 and 2 channels for connexin-43 (green) and βIV-tubulin (red). Cells close to the disruption have cytoplasmic masses of connexin-43 (arrow) or lack this protein (asterisk). **(E)** En bloc immunostaining for connexin-43 of an unaffected area (for orientation, see bottom rectangle in inset of **B**). Connexin-43 is confined to the plasma membrane forming gap junctions. **(F)** Double en bloc immunostaining for connexin-43 (green) and βIV-tubulin (red) of an area undergoing disruption. Connexin-43 appears as cytoplasmic masses (broken arrow) located either in NSCs or multiciliated ependyma [E]. **(G)** En bloc immunostaining for N-cadherin of an unaffected area. A complete belt of N-cadherin surrounds each cell. **(H)** In tissue sections of unaffected areas, N-cadherin localizes at the lateral domain of the plasma membrane. **(I)** Cells close to disruption have cytoplasmic masses of N-cadherin (broken arrow) or lack this protein (asterisk). **(J)** En bloc immunostaining for N-cadherin in cells located at a disruption front (DF). The protein accumulates in the cytoplasm (broken arrow). The full arrows point to discontinuities of the N-cadherin belt. The VZ cells show some degree of spatial organization, with multiciliated cells surrounding a nonciliated cell (asterisk). The same group of cells visualized with 2 channels for N-cadherin (green) and βIV-tubulin (red) is shown in the inset. Scale bars = **(A)** 8 μm; **(B)** 70 μm, inset, 150 μm; **(C, C')** 7 μm; **(D)** 15 μm; **(D', D'')** 5 μm; **(E)** 10 μm; **(F)** 10 μm; **(G)** 10 μm; **(H)** 10 μm; **(I)** 15 μm; **(J)** 4 μm.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016

VZ Disruption Results in Abnormal Translocation of NSCs/NPCs Into Ventricular CSF

Immunocytochemical as well as transmission electron microscopy and SEM studies of hyHTx fetuses and newborns showed that NPCs reach the ventricles through the disrupted VZ (Fig. 3H–L). Bromodeoxyuridine administration during the first postnatal week in hyHTx rats showed labeled cells, most likely corresponding to NPCs, protruding through the disrupted VZ (Fig. 3M). Pellets of CSF collected from PN1 and PN5 hyHTx rats injected with BrdU revealed the presence of cells immunoreactive with antibodies against BrdU, β III-tubulin, and nestin (Fig. 3N–P). These results indicate that proliferative NPCs, and probably NSCs, access the CSF. To test this hypothesis, we cultured these hyHTx cells to obtain neurospheres for comparison with those grown from the VZ/SVZ of nHTx and hyHTx.

NSCs/NPCs From CSF of hyHTx Rats Develop Into Neurospheres

Cerebrospinal fluid samples from hydrocephalic rats were processed for the neurosphere assay. Ten of 14 samples produced neurospheres ranging in size between 50 and 160 μ m in diameter, with the largest population being approximately 100 μ m diameter (Fig. 4A–G). Small and large neurospheres displayed distinct immunocytochemical characteristics (Fig. 4C–G). After 24-hour BrdU labeling, most labeled nuclei were located at the neurosphere surfaces (Fig. 4B). Nestin was also detected by immunoblotting in neurospheres grown for 4 and 6 DIV (Fig. 4D). Neurospheres grown from cells of hyCSF indicate that the NSCs/NPCs abnormally translocated to the CSF retained their capacity to proliferate and assemble. No neurospheres were obtained from the CSF of nHTx rats.

Neurospheres Formed by NSCs/NPCs From hyHTx Rat CSF Express Similar Cell Junction Abnormalities as VZ Cells Undergoing Disruption

Neurospheres obtained from the VZ/SVZ of nHTx rats (Fig. 4I–M) and from the CSF of hyHTx rats (Fig. 4N–R) were cultured in parallel and photographed under phase contrast microscopy twice daily for 7 consecutive days. After 2 DIV, hyCSF-derived neurospheres started to disassemble, resulting in numerous cells becoming free in the culture

medium (Fig. 4N–Q). After 6 and 7 DIV, most neurospheres had disassembled into numerous free isolated cells, some of which proliferated to form new neurospheres (Fig. 4P, Q, insets). When processed for light microscopy, these neurospheres displayed cells “disrupting” from the cortex (Fig. 4R).

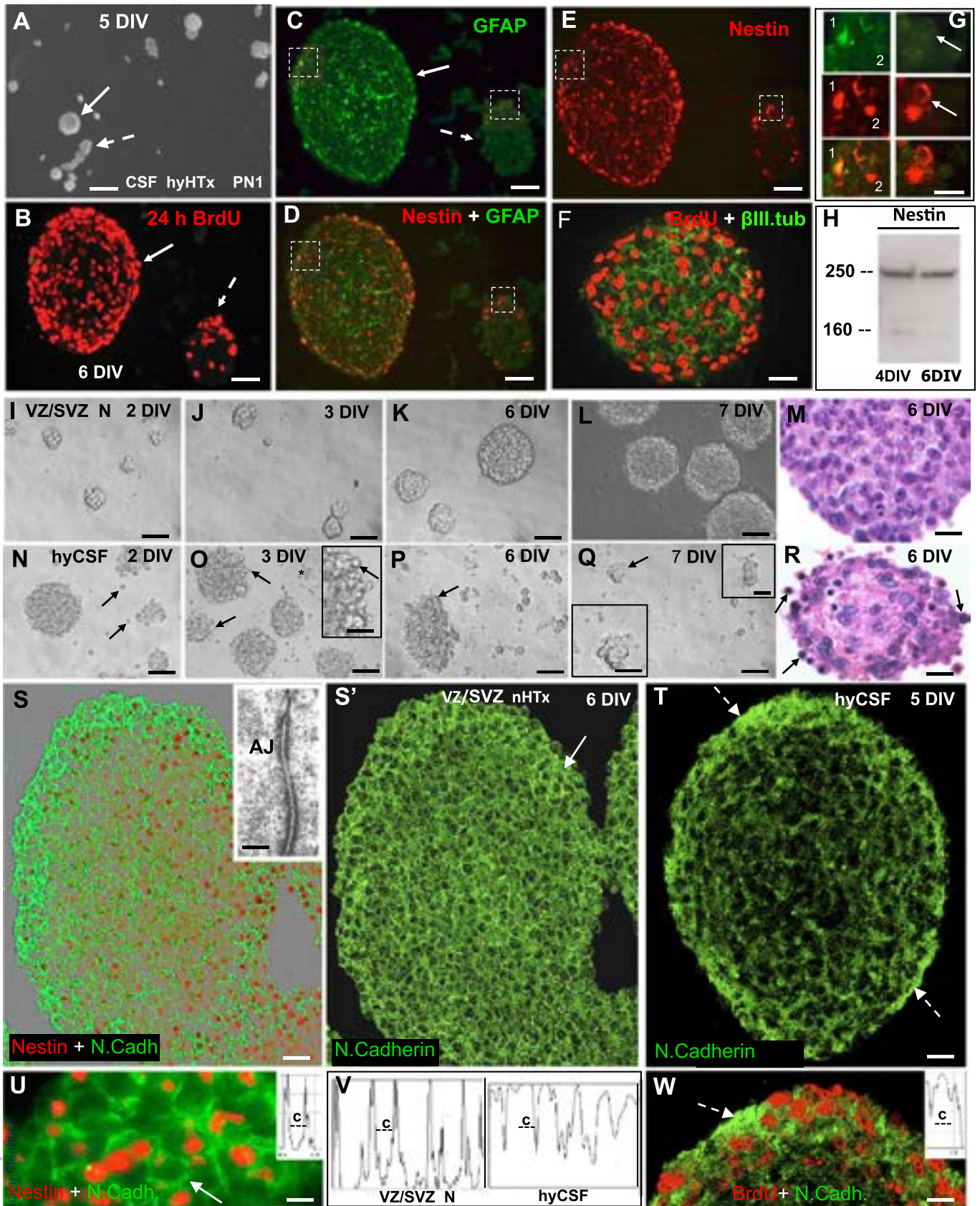
The cells of neurospheres obtained from hyCSF did not display N-cadherin at the plasma membrane domain but accumulated this protein in the cytoplasm (Fig. 4T, W). This clearly contrasted with the honeycomb appearance of N-cadherin in neurospheres obtained from the VZ/SVZ of nHTx rats (Fig. 4S, S', U). This phenomenon became more evident after microdensitometric recordings (Fig. 4V). These findings indicate that 1) the NSCs/NPCs reaching the CSF (although they did disrupt because of a junction pathology) can proliferate and become assembled again through adherens junctions when put into culture, and 2) a few days are necessary for the neurospheres to express the abnormalities and become disrupted.

Neurospheres From the VZ/SVZ of hyHTx Rats Have Abnormalities Resembling Those of Neurospheres Obtained From hyCSF

After 6 DIV, neurospheres developed from the VZ/SVZ of nHTx were formed by densely packed proliferative cells (Fig. 5A, C). Although nestin-positive cells distributed throughout the neurosphere, they were preferentially located at the periphery of the neurospheres (Fig. 5E, F), with their processes projecting to the central zone (or core) (Fig. 5B). A few β III-tubulin-positive cells displaying processes of different thicknesses and lengths and numerous spherical and multipolar GFAP-positive cells (i.e. differentiating astroblasts) populated the cores of the neurospheres (Fig. 5C, F). The neurosphere cells, particularly those at the periphery, were joined together by N-cadherin-based adherent junctions (Figs. 4S; 5D). Six DIV neurospheres from the VZ/SVZ of nHTx, processed for the differentiation assay, differentiated into multipolar β III-tubulin-positive neurons and multipolar GFAP-positive astrocytes (Fig. 5G).

The NSCs/NPCs from the VZ/SVZ of hyHTx rats produced neurospheres of different sizes and characteristics. Large neurospheres were approximately 200 to 300 μ m in diameter, with a core of loosely packed cells and a cortex with densely packed cells (Fig. 5H). The cortex was formed by proliferative (Fig. 5I) nestin-positive (Fig. 5L) cells. The cores

FIGURE 3. In the HTx rat, disruption of the ventricular zone (VZ) results in periventricular heterotopias (PHs) (A–G) and shedding of neural progenitor cells into the CSF (H–P). (A) PHs located close to a disruption front (arrow). (B) PH located under a cell layer formed by multiciliated cells and cells with a basal process (broken arrow); these processes divide the PH into compartments (full arrows). (C) Adjacent section processed for tomato lectin binding. Arrow points to bundles of basal processes of the cells in the VZ. (D, E) PHs are formed by β III-tubulin (β III-tub)-positive cells, some of which are proliferative and stain for bromodeoxyuridine (BrdU). GFAP, glial fibrillary acidic protein. (F, G) PHs visualized with 2 channels for GFAP (green) and β III-tubulin (red) (F) and with only the channel for GFAP (green). (H–K) Transmission electron microscopy of unaffected neural stem cells (NSCs) (H, I); arrow points to an adherens junction. Cells displaced to the ventricle through a disruption point were identified as NPCs (arrows) by transmission electron microscopy (I), scanning electron microscopy (J), and immunocytochemistry for β III-tubulin (K). (L) Line drawing depicting the pathology of hyHTx: loss of NSCs (outlined by broken line) and translocation of NPCs to the CSF. (M–P) Cells displaced to the ventricle and reaching the CSF retain the proliferative capacity, as shown by injection of BrdU in living animals and tracking the BrdU-positive cells in tissue sections (M, arrow) and CSF cell pellets (N, P). Cell pellet of CSF collected from a PN1 hyHTx rat is shown in N. Beta-III-tubulin-positive or nestin-positive cells were present in the cell pellet (O). Scale bars = (A) 125 μ m; (B) 35 μ m; (C) 10 μ m; (D) 125 μ m; (E) 10 μ m; (F, G) 20 μ m; (H) 3 μ m; (I) 5 μ m; (J) 12 μ m; (K) 14 μ m; (M) 50 μ m; (N) 10 μ m; (O) 8 μ m; (P) 10 μ m.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016



were devoid of proliferative cells and were populated by numerous multipolar β III-tubulin-positive cells (Fig. 5M), with only a few GFAP-positive cells. Smaller neurospheres, approximately 40 to 100 μ m in diameter, were formed by densely packed cells with strongly labeled BrdU-positive nuclei distributed throughout (Fig. 5I). Nestin-positive cells and spherical β III-tubulin-positive cells were evenly distributed (Fig. 5L, M). These characteristics suggest that small neurospheres are younger than large neurospheres, and they are born from cells disrupting from large neurospheres. This possibility is supported by findings under phase contrast microscopy (inset, Fig. 5H) and by the abnormal subcellular location of N-cadherin (Fig. 5J, K). After 6 DIV, neurospheres from the VZ/SVZ of hyHTx rats processed for the differentiation assay differentiated into multipolar β III-tubulin-positive neurons and multipolar GFAP-positive astrocytes (Fig. 5N), indicating that, despite their junction pathology, hydrocephalic NSCs retained the potential for differentiation into neuron and glia.

Human Hydrocephalic Fetuses Also Display Disruption of the Telencephalic VZ and Abnormal Junction Protein Expression

In the telencephalon of control human fetuses, a temporospatial pattern of VZ differentiation resembling that of the rat was observed. In 16, 21, and 22 GW fetuses, the VZ of the telencephalon was formed by NSCs and few multiciliated ependymal cells (Fig. 6A, A', B, B'). In 25 and 30 GW fetuses, one wall of the lateral ventricle was lined by ependyma and the other by NSCs; both cell types had N-cadherin at the plasma membrane (Fig. 6C, C', D). In the 33 to 40 GW fetuses, the wall of the lateral ventricle was mostly formed by multiciliated mature ependyma.

In hydrocephalic fetuses, the VZ cells, either NSCs or ependyma, underwent disruption. In young hydrocephalic fetuses (21, 22 GW), disruption occurred in the pallium whereas, in 40-week fetuses, the disruption extended to other regions of the lateral ventricles (Figs. 6E; 7A, B, D). Ependymal cells close to a disrupted area (probably corresponding to candidate cells for disruption) accumulated N-cadherin and caveolin 1 as large masses in the cytoplasm (Fig. 6G, I, I'). By contrast,

the ependymal cells of control fetuses (Fig. 6C, D, H) and those of the nondisrupted regions of the hydrocephalic fetuses (Fig. 6F) localized N-cadherin at the lateral domain of the plasma membrane and caveolin 1 close to the apical and basal domains of the plasma membrane.

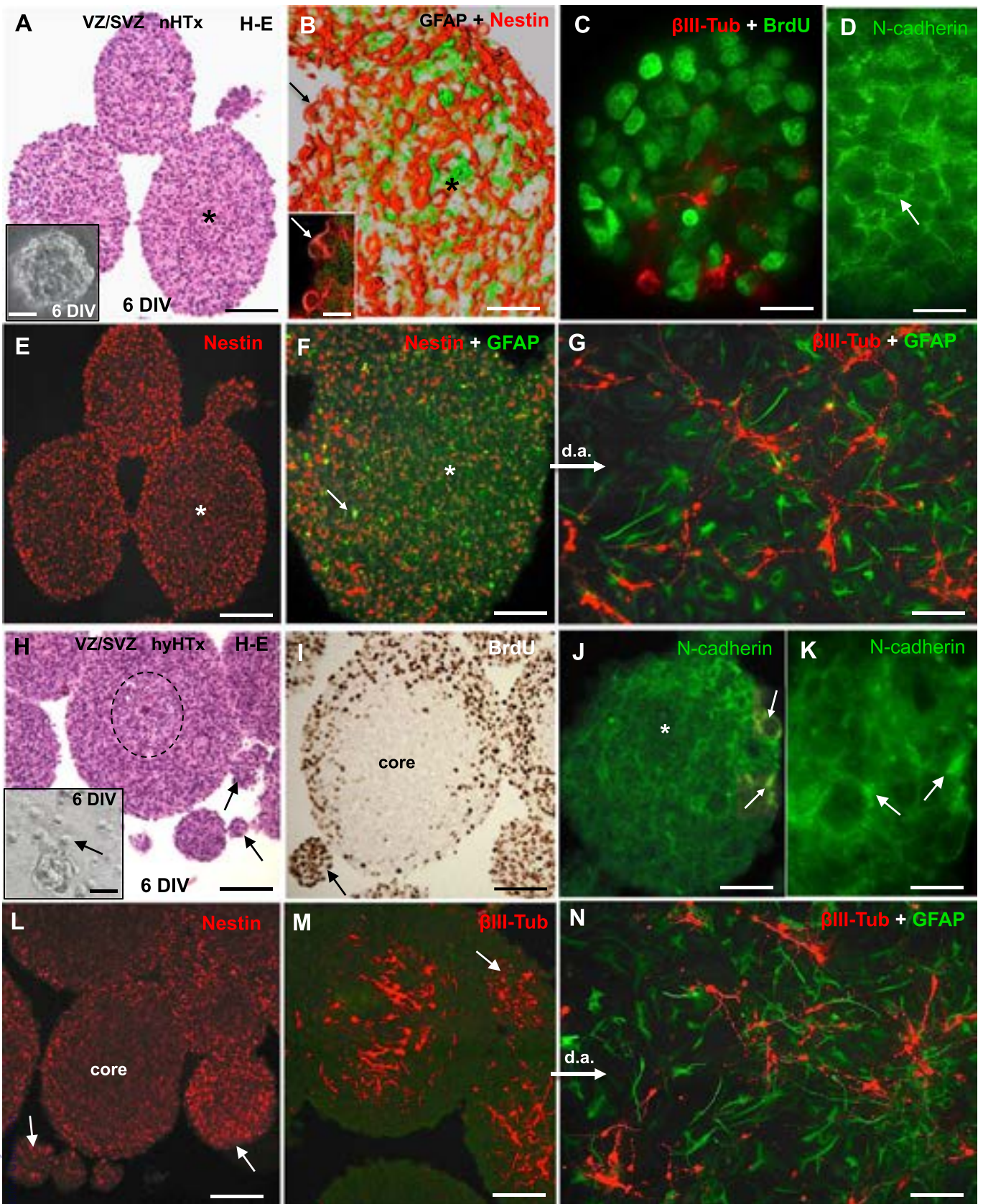
Disruption of the VZ in Human Hydrocephalic Fetuses Leads to Abnormal Migration of NPCs and Neuroblasts

In human hydrocephalic fetuses, VZ disruption was associated with several abnormalities, as follows: 1) β III-tubulin-positive cells in the SVZ (Fig. 7F) were translocated into the ventricle at the sites of VZ disruption (Fig. 7A', A'', B, D, G). 2) Subependymal rosettes formed close to the site of VZ disruption were composed of GFAP-positive cells with long basal processes and displayed little or no N-cadherin (Fig. 7B, D, H, I). 3) Periventricular heterotopias formed close to the site of VZ disruption consisted of β III-tubulin-positive neuroblasts arrested near the SVZ (Fig. 7A–C). The neighboring disrupted VZ was covered with a layer of astrocytes, indicating that the disruption and PH formation had occurred earlier in development (Fig. 7C). Periventricular heterotopias were already found in the 21 GW embryo (Fig. 7A, A'), as well as in full-term fetuses (40 GW) (Fig. 7C). 4) In 3 hydrocephalic fetuses, large clusters of β III-tubulin-positive cells were seen within the perivascular space, far from the ventricle, suggesting that in the absence of radial glia, a bulk of neuroblasts used blood vessels as scaffold for migration (Fig. 7B, B'').

DISCUSSION

Fetal-onset hydrocephalus is heterogeneous, and genetic and environmental factors, such as vitamin B or folic acid deficiency (3), viral infection of ependyma (4), and prematurity-related germinal matrix and intraventricular hemorrhage (5), contribute to its occurrence. The association between onset and evolution of congenital hydrocephalus and stenosis/obliteration of the aqueduct of Sylvius is somewhat controversial. There are reports indicating that morphologic abnormalities of the aqueduct account for a low percentage (10%–25%) of fetal hydrocephalus (27, 28). However, there are several types of neural tube

FIGURE 4. (A) Neural stem cells/neural precursor cells (NSCs/NPCs) collected from the CSF of a PN1 hyHTx rat form small (broken arrows) and large (full arrows) neurospheres. DIV, days in vitro. (B) The neurospheres contain bromodeoxyuridine (BrdU)-positive proliferative cells. (C–F) Large neurospheres contain nestin-positive cells located at the periphery (D, E) and a few glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive (C, D) and numerous β III-tubulin (β III.tub)-positive cells at the core (F). Small neurospheres contained β III-tubulin-positive cells and lacked GFAP-positive cells (C, broken lines). (G) Detailed magnification of areas framed by squares in C, D, and E. (H) Immunoblot for nestin of neurospheres collected after 4 and 6 DIV. (I–Q) Phase contrast microscopy of living neurospheres from the ventricular zone/subventricular zone (VZ/SVZ) of a nonhydrocephalic (nHTx) rat after 2, 3, 6, and 7 DIV (I–L) and from the CSF of PN1 hyHTx rats after 2, 3, 6, and 7 DIV (N–Q). From 2 DIV on, neurospheres from the CSF started to disassemble (arrows). At 7 DIV (Q), isolated cells and small growing neurospheres, most likely formed by disrupted cells, started to appear (arrow). Top inset, dividing cell; bottom inset, small growing neurosphere. Paraffin section of a neurosphere from VZ/SVZ of an nHTx rat (M). (R) Paraffin section of a neurosphere from hydrocephalic rat CSF (hyCSF), similar to that shown in (D); it had an irregular outline, with cells “disrupting” from its periphery (arrows). (S, S', U) In neurospheres from the VZ/SVZ of an nHTx rat, N-cadherin was located at the plasma membrane domain, forming a continuous belt. This is also shown in the microdensitometric recording (V, left panel) (c, cytoplasm). Inset in (S), transmission electron microscopy showing neurosphere cells joined by adherens junctions (AJ). (T, W) Neurospheres from hyCSF expressed abnormalities of N-cadherin similar to those expressed by NSCs of mutant animals. N-cadherin accumulated in the cytoplasm of neurosphere cells (broken arrows). This is also shown in the microdensitometric recording (V, right panel). Scale bars = (A) 125 μ m; (B–E) 25 μ m; (F) 15 μ m; (G, M, R) 10 μ m; (I–L, N–Q) 50 μ m; (S, S', T) 20 μ m; (U, W) 8 μ m.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016

defects that are associated with both congenital hydrocephalus and aqueductal stenosis, indicating that both phenomena are more intimately associated than formerly thought. There is an X-linked syndrome, occurring in approximately 1:30,000 births, characterized by congenital hydrocephalus and stenosis of the aqueduct, and 25% of males with aqueductal stenosis have X-linked hydrocephalus (1). Although no other gene mutations associated with aqueduct stenosis and hydrocephalus have been identified in humans, a long series of gene mutations in mice that trigger aqueduct stenosis and hydrocephalus has been reported in recent years (9).

Spina bifida, a distal neural tube defect, is associated with a wide range of CNS malformations, the most frequent being the obstruction of CSF flow within the ventricular system (92%) and a disorder of migration of cortical neurons (92%) (2). Gilbert et al (2) postulated that spina bifida and brain malformations must be considered part of a spectrum of malformations caused by an unidentified primary CNS insult. However, there is no agreement with respect to the degree of association between spina bifida and aqueductal stenosis (3, 27–31). In this respect, it is worth considering that, in animal models of congenital hydrocephalus, aqueduct stenosis is a process starting in fetal life and finishing early after birth (17–19). There is evidence that this process may also occur in human congenital hydrocephalus (15, 16). Therefore, the presence or absence of aqueduct stenosis depends on the developmental stage under investigation. Furthermore, a patent aqueduct may display a functional stenosis derived from disruption of the multiciliated ependyma (16).

Recent investigations focused on the cellular and molecular phenomena underlying fetal-onset hydrocephalus have brought new insights to this pathologic spectrum. Studies on numerous mutant animal models indicate that a disruption of the VZ of the aqueduct, starting early in development, triggers aqueduct stenosis and hydrocephalus (17–19). A

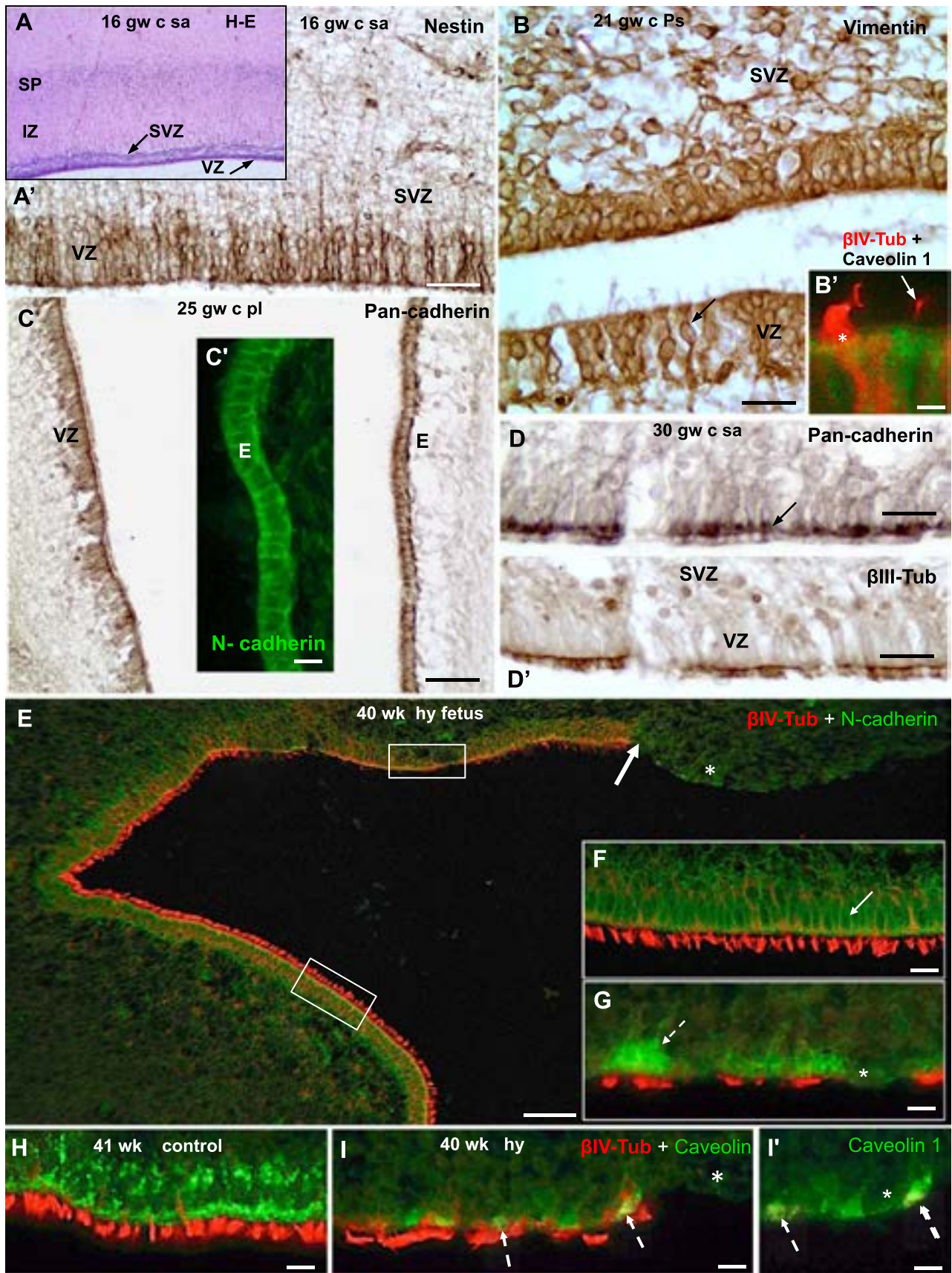
similar phenomenon seems to take place in cases of human congenital hydrocephalus (15, 16).

The evidence strongly indicates that fetal-onset hydrocephalus is not only an alteration of CSF dynamics but also a brain disorder that is triggered by multiple factors. How can we explain why surgery does not reverse the neurologic impairment suffered by neonates with fetal-onset hydrocephalus? The present findings indicate that fetal-onset hydrocephalus and abnormal neurogenesis should be regarded as 2 inseparable phenomena because they share a common origin: a primary pathology of the VZ (Fig. 8). It is tempting to suggest that VZ disruption would be the “unidentified primary insult to the CNS” leading to distal neural tube defects and brain malformations, as suggested by Gilbert et al (2).

The process of VZ disruption, first affecting the cerebral aqueduct, also reaches the telencephalon (15, 17–19, present report). We investigated VZ disruption in the telencephalon of both mutant HTx rats and human hydrocephalic fetuses. Our data support the notion that cell junction abnormalities of VZ cells of the telencephalon lead to both VZ disruption and neurogenesis abnormalities.

The VZ and SVZ are the source of most cells of the brain. With the exception of microglia, all other cells of the developing brain originate in the VZ and SVZ (Fig. 9A) (12–14, 32, 33). The VZ contains multipotent NSCs that are bathed in the fetal CSF and project long basal processes that reach the pial surface (Fig. 9A). A hallmark of NSCs is their primary cilia, which project to the ventricle (34, 35). Neural stem cells progressively differentiate into multiciliated ependyma (1). In rodents, differentiation of ependyma starts late in development and is completed by the first postnatal week (16, 36, present report). In humans, ependymal cell differentiation starts at about the fourth week of gestation and is completed around the 22nd gestational week (37, 38). The SVZ contains the neural precursors, which lose contact with the ventricular

FIGURE 5. Neurospheres from the ventricular zone/subventricular zone (VZ/SVZ) of hyHTx rats have abnormalities resembling those of neurospheres from the CSF of hyHTx rats. Paraffin sections of neurospheres from the VZ/SVZ of PN1 nonhydrocephalic (nHTx) rats after 6 days in vitro (DIV) (**A–F**) and from the VZ/SVZ of PN1 hyHTx rats after 6 DIV (**H–M**). (**A**) Neurospheres from an nHTx rat stained with hematoxylin and eosin. The asterisk indicates the same neurosphere shown in **B**, **E**, and **F**. Inset: Phase contrast microscopy of a living neurosphere from an nHTx rat displaying a compact appearance. (**B**) Reconstruction of confocal z-axis images of a neurosphere double immunolabeled for nestin (red) and glial fibrillary acidic protein (GFAP, green). The network of neural stem cells and their processes is evident. The arrows point to the same cell shown in the inset in a z-axis through the cell body and its process (inset). (**C**) Neurosphere immunolabeled for bromodeoxyuridine (BrdU, green) and β III-tubulin (red). Most nuclei are BrdU positive. The few β III-tubulin-positive cells project processes of different thicknesses and lengths. (**D**) Neurosphere immunolabeled for N-cadherin. The protein is confined to the plasma membrane domain, forming a continuous belt (arrow). (**E**) Section adjacent to that of (**A**). Nestin-positive cells are preferentially located at the periphery of neurospheres. (**F**) Section adjacent to that of (**E**). Nestin-positive cells (red) concentrate at the periphery, whereas spherical and multipolar GFAP-positive cells (green, differentiating astroblasts) start to populate the core of neurospheres (arrow). (**G**) Six DIV neurospheres processed for the differentiation assay (d.a.) differentiate into multipolar β III-tubulin-positive neurons (red) and multipolar GFAP-positive astrocytes (green). (**H**) Neurospheres from hyHTx rats, showing small (arrows) and large neurospheres; the latter have a core of loosely arranged cells (broken circle). Inset. Phase contrast microscopy of a small living neurosphere from an hyHTx rat with numerous isolated cells in the vicinity (arrow). (**I**) In large neurospheres, BrdU-positive nuclei are confined to the periphery, whereas the core is free of proliferating cells. All nuclei of small neurospheres are strongly BrdU positive (arrow). (**J**, **K**) Neurosphere from an hyHTx rat immunolabeled for N-cadherin. The protein appears as cytoplasmic masses in many cells (arrows) whereas, in others, N-cadherin is missing (asterisk). (**L**) In large neurospheres, nestin-positive cells are confined to the periphery whereas, in small neurospheres, they are distributed throughout (arrow). (**M**) In large neurospheres, numerous multipolar β III-tubulin-positive cells populate the core (asterisk), whereas spherical β III-tubulin-positive cells are distributed throughout in small neurospheres (arrow). (**N**) Six DIV neurospheres processed for the d.a. differentiate into multipolar β III-tubulin-positive neurons (red) and multipolar GFAP-positive astrocytes (green). Scale bars = (**A**) 80 μ m, inset, 15 μ m; (**B**) 38 μ m, inset, 15 μ m; (**C**, **D**) 15 μ m; (**E**) 80 μ m; (**F**) 42 μ m; (**G**) 60 μ m; (**H**) 115 μ m, inset, 24 μ m; (**I**) 70 μ m; (**J**) 40 μ m; (**K**) 20 μ m; (**L**) 115 μ m; (**M**) 60 μ m.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016

surface, proliferate extensively, and then differentiate into neuroblasts that migrate using the basal process of NSCs as scaffolding (Fig. 9A) (33, 39).

The Mutation of a Wide Spectrum of Genes May Lead to VZ Disruption

The disruption of the VZ follows a program that has temporal and spatial patterns, progressing as a “tsunami” wave, leaving behind severe damage (9, 17–19). Ventricular zone disruption starts at early embryological stages when this zone is formed by the NSCs (17–19) and continues during developmental stages when the VZ is formed by multiciliated ependyma (40, present findings). Although the disruption process affects both cell lineages equally, NSCs are affected during the key initial stages of the pathology. The loss of NSCs/ependyma occurs at specific regions of the Sylvian aqueduct and ventricular walls and at specific stages of brain development. This explains why only certain brain structures have abnormal development, which, in turn, results in specific neurologic impairments.

Disruption of the VZ occurs in human hydrocephalic fetuses (15, 16) and in a series of mutant mice, each one carrying a mutation for apparently nonrelated proteins, such as α Snap (17, 41, 42), Lgl1 (43), atypical protein kinase C-lambda (aPKC λ) (44), and nonmuscle myosin II-B (NMII-b) (45). What do such a variety of gene mutations have in common so that they all result in VZ disruption?

Intercellular Junction Abnormalities of NSCs/Ependymal Cells Are a Final Common Pathway of Gene Mutations That Lead to VZ Disruption

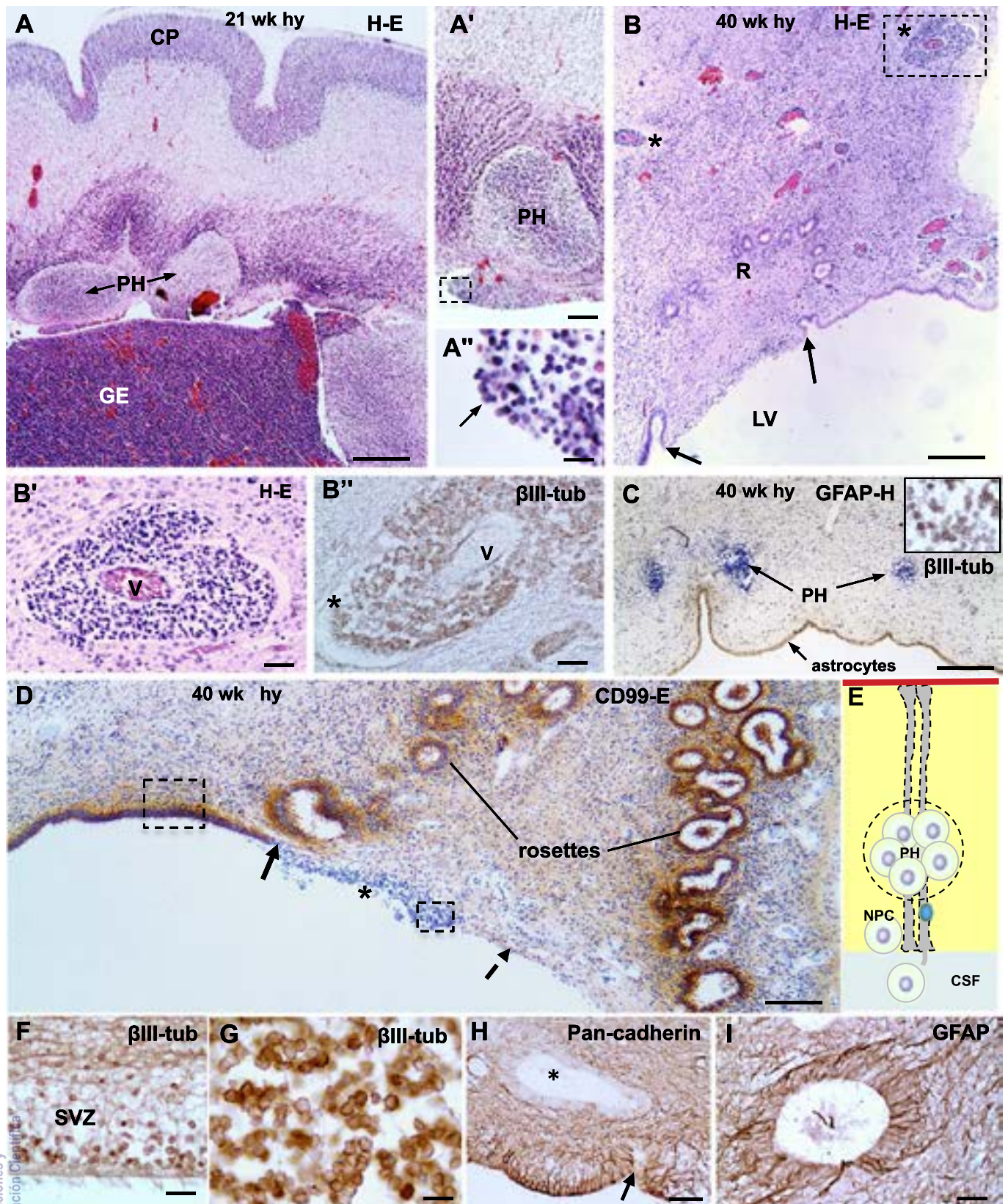
Several studies indicate that disruption of the VZ arises from a final common pathway involving alterations of vesicle trafficking, abnormal cell junctions, and loss of VZ integrity (20, 43–46, present report). Our findings of abnormal localization of N-cadherin and connexin-43 in NSCs/ependymal cells and the formation of subependymal rosettes suggest that VZ disruption results from a defect in cell polarity and in cell-to-cell adhesion of VZ cells. This view is in line with reports on the role of N-cadherin for maintaining the normal architecture of the neuroepithelium and NSCs (44–47). Up to E12, neuroepithelial cells are joined together by gap, adherens, and tight junctions (9, 34, 35). From E12 onward, when neuroepithelial cells differentiate into NSCs, tight junctions are missing and cell-to-cell adhesion of NSCs relies

on gap and adherent junctions. It is exactly at this time when disruption of the VZ starts in mutant hyh mice (17). Interestingly, specific domains of the ventricular walls that are permanently endowed with tight junctions, such as the sub-commissural organ, choroid plexus, and hypothalamic tanyocytes, never disrupt (19).

The accumulation of N-cadherin and connexin-43 in the soon-to-detach VZ cells in HTx rats and their virtual absence from the plasma membrane (present report) suggest that these molecules are synthesized but are not properly transported to the plasma membranes of the cells. The mechanism involved in this abnormal expression and translocation of N-cadherin is unknown. Knockout of PTB, an RNA-binding protein expressed in NSCs, induces the gradual loss of adherens junctions in the VZ, then VZ disruption and hydrocephalus onset (11). The Numb and Numbl proteins are required for maintaining adherent junctions in NSCs; Numb and Numbl double-knockout animals develop hydrocephalus (46). The specific disruption of N-cadherin-based junctions is enough to induce ependymal disruption. Indeed, the use of N-cadherin antibodies or synthetic peptides harboring a cadherin-recognition sequence triggers the detachment of ependymal cells from explants of the dorsal wall of the Sylvian aqueduct (21). The abnormal localization of connexin-43 in NSCs/ependymal cells could be associated with the faulty localization of N-cadherin. Indeed, it has been reported that gap junction proteins are delivered to the plasma membrane at adherent junction sites (48).

The nature of the genetic defect expressed in the HTx rat and in hydrocephalic patients (15–19) is unknown. We postulate that they all carry a defect at one or another point of the pathways assembling adherens and gap junctions, but non-genetic mechanisms leading to VZ disruption also have to be considered (49, 50). Indeed, lysophosphatidic acid, a blood-borne factor found in intraventricular hemorrhages, binds to receptors expressed by the VZ cells and triggers VZ disruption and hydrocephalus (49). Vascular endothelial growth factor is elevated in the CSF of patients with hydrocephalus and, when it is administered into the CSF of normal rats, it causes alterations of adherens junctions, ependyma disruption, and hydrocephalus (50). Thus, the possibility that signals from the hydrocephalic CSF may contribute to, or even trigger VZ disruption, has to be kept in mind. Furthermore, fetal CSF is the internal milieu of NSCs playing a key role on brain development (51), and the CSF of hyHTx rats has an abnormal protein

FIGURE 6. (A–D’) Control (nonhydrocephalic) human fetuses at 16 (**A, A’**), 21 (**B, B’**), 25 (**C, C’**), and 30 (**D, D’**) gestational weeks (GW) of age showing normal ventricular zone (VZ) and subventricular zone (SVZ). sa, spontaneous abortion; Ps, Potter syndrome; pl, premature labor. **(A)** Pallium stained with hematoxylin and eosin [H-E]. The VZ, SVZ, intermediate (IZ) zone, the subplate (SP), and the cortical plate (CP) were readily distinguishable. The cells of the VZ were strongly reactive for nestin (**A’**), and cadherin was located at the lateral plasma membrane domain (**C’**). **(B)** In the 21 GW control fetus, the cells of the VZ were strongly reactive for vimentin. At this stage, multiciliated (asterisk) and monociliated (arrow) cells were readily distinguishable using antibodies against β IV-tubulin (β IV-tub) (**B’**). The integrity of the VZ and SVZ was also revealed in the 25 and 30 GW fetuses using antibodies for pan-cadherin (**D**) and β III-tubulin (**D’**). Cells of the VZ displayed pan-cadherin and N-cadherin at the lateral plasma membrane domain, especially at the apical cell pole (arrow in **D**). Ependyma [E]. **(E)** Pallium of a human hydrocephalic fetus showing zones lined by normal (lower rectangle) or abnormal (upper rectangle) ependyma. Asterisk, denuded area; arrow, disruption front. The areas framed are shown in **(F)** and **(G)**. Close to the disruption front, ependymal cells displayed abnormal expression of N-cadherin (**G**) and caveolin 1 (**I, I’**) (broken arrows, asterisks). In areas of intact ependyma, N-cadherin is localized at the plasma membrane (**F**, arrow); caveolin 1 is confined to both cell poles (**H**). Scale bars = **(A)** 160 μ m; **(A’, F)** 20 μ m; **(B, E)** 30 μ m; **(B’, H, I, I’)** 7 μ m; **(C)** 30 μ m; **(C’)** 12 μ m; **(D, D’)** 24 μ m; **(G)** 10 μ m.



Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016



composition, which might contribute to the abnormal neurogenesis that occurs in this mutant (52–55).

Outcomes of the Disruption of NSCs/Ependymal Cells: Hydrocephalus and Abnormal Neurogenesis

In the *hyh* mouse, programmed disruption of the VZ of the ventral wall of the Sylvian aqueduct starts early in fetal life (E12.5) and precedes the onset of a communicating hydrocephalus. The loss of the ependyma of the dorsal wall of the aqueduct occurring shortly after birth leads to fusion of the denuded ventral and dorsal walls of the aqueduct, aqueduct obliteration, and severe hydrocephalus (17–19). Ventricular zone disruption associated with the onset of hydrocephalus has also been found in other mutant mice (43–46, 56) and in spontaneously aborted fetuses (16). Thus, disruption of the VZ in the aqueduct of Sylvius leads to hydrocephalus.

In human hydrocephalic fetuses and the HTx rat, the VZ disruption results in 2 neuropathologic events: formation of PH and translocation of NSCs/NPCs to the CSF (Fig. 9B). It seems likely that, at regions of disruption where NSCs have been lost, the neuroblasts generated in the SVZ no longer have the structural scaffolding to migrate and consequently accumulate in periventricular areas to form PH. The facts that PHs are present in adult HTx rats and that they are formed mostly by β III-tubulin–positive cells with a low rate of proliferation indicate that these cells likely correspond to arrested neuroblasts. In the human hydrocephalic fetuses studied, PHs were found in young (21 GW) and full-term (40 GW) fetuses, indicating that they likely were formed early in development and had remained in situ until the end of fetal life and probably after birth. Indeed, a 2-month-old child with a disrupted VZ had PHs (20). Periventricular heterotopias behave as epileptogenic foci (57), and epilepsy affects 6% to 30% of congenital hydrocephalus patients (58, 59).

In 3 of the human hydrocephalic fetuses studied, large clusters of β III-tubulin–positive cells were seen within the perivascular space, far from the ventricle. This suggested that, in the absence of the NSCs, a bulk of neuroblasts uses blood vessels as scaffold for migration. Several recent articles have demonstrated that neuroblasts can use blood vessels as a scaffold to migrate to the cerebral cortex of newborn rats (60), the olfactory bulb of adult rats (61), and damaged brain areas after stroke (62–64).

The fact that all of these cerebral abnormalities are irreversible inborn defects may explain why a large number of hydrocephalic children develop neurologic disorders that are not resolved by surgical treatment.

Gene mutations, internal and foreign signals

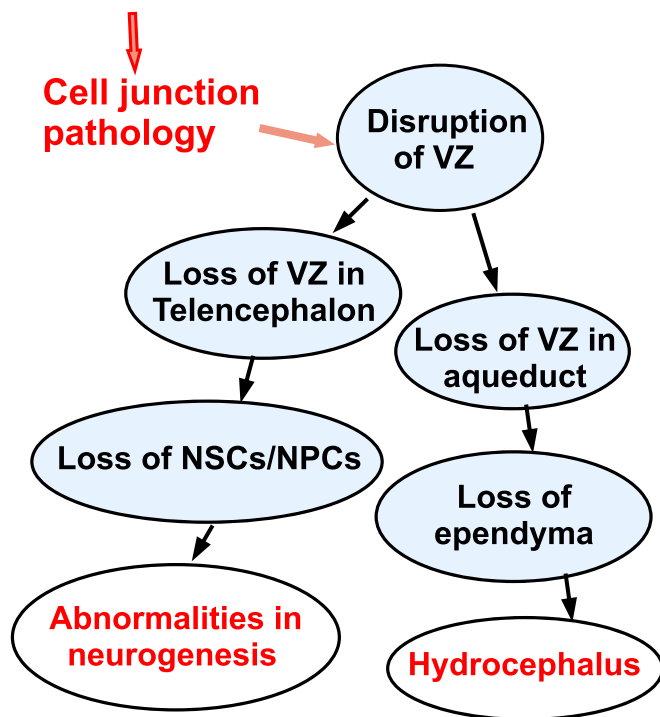


FIGURE 8. Whereas disruption of ventricular zone (VZ) in the aqueduct of Sylvius leads to hydrocephalus, VZ disruption in the telencephalon results in abnormal neurogenesis. Cell junction pathology appears to be a final common pathway of multiple genetic and environmental factors that finally result in the disruption of the VZ. NSCs, neural stem cells; NPCs, neural progenitor cells.

Disrupted NSCs/NPCs Are Shed Into the CSF

In hydrocephalic human fetuses, NSCs/NPCs reach the ventricle at sites of VZ disruption (15, present report) and can be collected from the CSF (15, 65). Furthermore, we found that cells collected from CSF of 2 spontaneously aborted fetuses developed into neurospheres (unpublished finding). In the HTx rat, proliferative β III-tubulin–positive NPCs from the SVZ reach the ventricle through the sites of VZ disruption and can be collected from the CSF. Nestin-positive NSCs from the VZ also appear to reach the CSF (present report). When processed for the neurosphere assay, cells collected from CSF

FIGURE 7. Disruption of the ventricular zone (VZ) of human hydrocephalic fetuses leads to abnormalities in neurogenesis. (A–A'') Telencephalon of a human hydrocephalic fetus, 21 gestational weeks (GW) of age, showing periventricular heterotopias (PHs) associated with disruption of the VZ and translocation of cells into the ventricle (A'', arrow). (B, C) Telencephalon of a human hydrocephalic fetus at 40 GW of age with a large denuded area (B, arrows), subependymal rosettes (R), β III-tubulin (β III-tub)–positive cells in the perivascular space (B, asterisks; B', B'') and PHs formed by β III-tub–positive cells (C, inset). The denuded ventricular surface is covered by a layer of glial fibrillary acidic protein (GFAP)–positive astrocytes (C). (D) Lateral ventricle of a hydrocephalic human fetus showing VZ disruption (full arrow), subependymal rosettes (R), and SVZ cells translocated into the ventricle (asterisk). Left rectangle, area similar to that of (F); broken arrow, denuded region; right rectangle, area similar to that of (G). (E) Line drawing depicting abnormalities in neurogenesis because of VZ disruption, formation of PHs and translocation of neural progenitor cells into the CSF. (F, G) At sites of intact VZ, β III-tub–positive cells are located in the SVZ (F) whereas, at disrupted sites, β III-tub–positive cells reached the ventricle (G). (H, I) Cells forming the rosettes having little or no cadherin immunoreactivity (H, asterisk) are GFAP positive and have long basal processes (I). Scale bars = (A–C) 300 μ m; (A') 120 μ m; (A'', F) 25 μ m; (B', B'') 40 μ m; (D) 150 μ m; (G) 10 μ m; (H, I) 30 μ m.

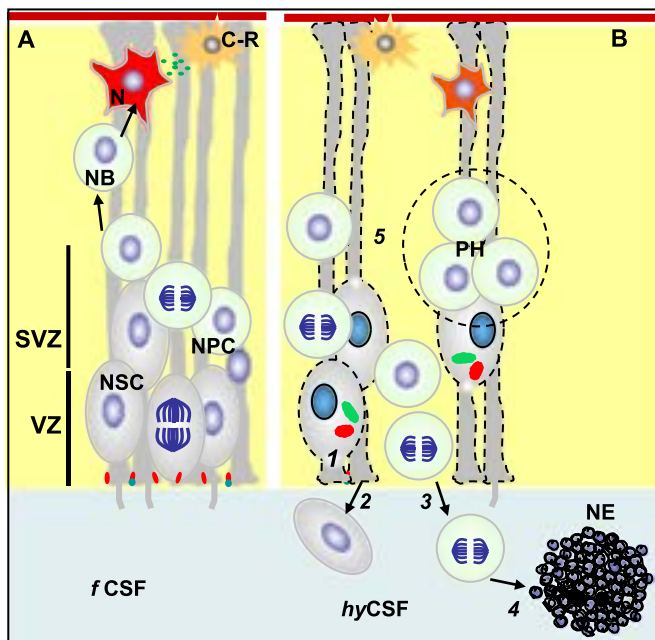


FIGURE 9. (A) The ventricular zone (VZ) is formed by neural stem cells (gray, NSCs). The subventricular zone (SVZ) contains the proliferative neural progenitor cells (light green, NPCs), which migrate as neuroblasts (NBs) along radial processes of NSCs and differentiate into neurons (N) that form the cerebral cortex. Cajal-Retzius cell (C-R). VZ cells are joined by adherens and gap junctions (red, blue). Specialized areas of the VZ secrete signal compounds into the fetal cerebrospinal fluid (fCSF). **(B)** Disruption of the VZ because of cell junction pathology of NSCs results in displacement of NSCs [1] and NPCs [2] into the CSF [3]. These cells can be collected from the CSF of hydrocephalic rats and cultured. They develop abnormal neurospheres [4]. The absence of the scaffold provided by NSCs results in arrested neuroblasts that form periventricular heterotopias (PHs) [5].

proliferated and reassembled through adherens junctions to form neurospheres. In view of the different duration of the cell cycle of NSCs and NPCs (66), we suggest that large neurospheres derive from NSCs and small neurospheres from NPCs. This possibility is supported by their distinct immunocytochemical characteristics.

After 2 DIV, the neurospheres started to express an adherens junction pathology and became disrupted, mirroring the features of NSCs in the VZ of live hyHTx rats, as well as that of neurospheres developed from the pallium of hyHTx rats. This finding indicates that a genetic defect and not epigenetic factors, such as increased CSF pressure or changes of CSF composition, underlies the disruption phenomenon. The present findings suggest that NSCs/NPCs collected from the CSF of hydrocephalic patients might be used to investigate cell and molecular alterations underlying the disease.

In summary, the present investigation identifies a new mechanism underlying the abnormal neurogenesis associated with fetal-onset hydrocephalus. Abnormalities of cell junction molecules in NSCs/NPCs are associated with the disruption of the VZ, the formation of PHs, and abnormal translocation of NSCs/NPCs to the fetal CSF. The outcomes of these

abnormalities continue to the end of fetal life and most likely continue during postnatal life. These abnormalities might explain some of the neurologic impairments (e.g. epilepsy) of children born with hydrocephalus. They also provide the basis for the use of the neurosphere assay for diagnosis and cell therapy (9, 67). We agree with Del Bigio (68) and Williams et al (69) that better treatment of hydrocephalus and the associated neurologic impairment will come from a better understanding of the biologic basis of the brain abnormalities in hydrocephalus.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to acknowledge the valuable technical support of Mr Genaro Alviaf from Universidad Austral de Chile and Dr Francisco Nualart from Centro de Microscopia Avanzada, Universidad de Concepción, for his support in laser microscopy. Monoclonal antibodies against nestin and BrdU were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, Iowa.

REFERENCES

1. Edwards JH. The syndrome of sex-linked hydrocephalus. Arch Dis Child 1961;36:486–93
2. Gilbert JN, Jones KL, Rorke LB, et al. Central nervous system anomalies associated with meningocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: Reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects. Neurosurgery 1986;18:559–64
3. Jellinger G. Anatomopathology of nontumoral aqueductal stenosis. J Neurosurg Sci 1986;30:1–16
4. Johnson RT, Johnson KP, Edmonds CJ. Virus-induced hydrocephalus: Development of aqueductal stenosis in hamsters after mumps infection. Science 1967;157:1066–67
5. Boop FA. Posthemorrhagic hydrocephalus of prematurity. In: Cinalli C, Maixner WJ, Sainte-Rose C, eds. Pediatric Hydrocephalus. Milan, Italy: Springer-Verlag, 2004:121–31
6. Del Bigio MR. Ependymal cells: Biology and pathology. Acta Neuropathol 2010;119:55–73
7. Jones HC, Klinge PM. Hydrocephalus 2008. 17–20th September, Hannover Germany: A conference report. Cerebrospinal Fluid Res 2008;5:19
8. Carter CS, Vogel T, Zhang Q, et al. Abnormal development of NG2⁺ PDGFR- α ⁺ neural progenitor cells leads to neonatal hydrocephalus in a ciliopathy mouse model. Nat Med 2013;18:1797–804
9. Rodríguez EM, Guerra M, Vío K, et al. A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus. Biol Res 2012;45:231–41
10. Rouso DL, Pearson CA, Gaber ZB, et al. Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. Neuron 2012;74:314–30
11. Shibasaki T, Tokunaga A, Sakamoto R, et al. PTB deficiency causes the loss of adherens junctions in the dorsal telencephalon and leads to lethal hydrocephalus. Cereb Cortex 2013;23:1824–35
12. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:777–88
13. Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. Cell Tissue Res 2008;331:165–78
14. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. Curr Opin Cell Biol 2006;18:704–9
15. Domínguez-Pinos MD, Páez P, Jiménez AJ, et al. Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. J Neuropathol Exp Neurol 2005;64:595–604
16. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WF, et al. Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. Brain Pathol 2011;21:163–79

17. Jiménez AJ, Tomé M, Páez P, et al. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the *hyh* mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1105–19
18. Páez P, Bátiz LF, Roales-Buján R, et al. Patterned neuropathologic events occurring in *hyh* congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:1082–92
19. Wagner C, Bátiz LF, Rodríguez S, et al. Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of *hyh* mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1019–40
20. Ferland RJ, Bátiz LF, Neal J, et al. Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum Mol Genet* 2008;18:497–516
21. Oliver C, González C, Alvia G, et al. Disruption of CDH2/N-cadherin-based adherens junctions leads to apoptosis of ependymal cells and denudation of brain ventricular walls. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:846–60
22. Yamamoto H, Maruo T, Majima T, et al. Genetic deletion of *afadin* causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain. *PLoS One* 2013;8:e0356
23. Chae TH, Kim S, Marz KE, et al. The *hyh* mutation uncovers roles for Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 2004;36:264–70
24. Orloff AR, Vio K, Guerra M, et al. Role of the subcommissural organ in the pathogenesis of congenital hydrocephalus in the HTx rat. *Cell Tissue Res* 2013;352:707–25
25. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase–antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18:315–33
26. Rodríguez EM. Fixation of the central nervous system by perfusion of the cerebral ventricles with a threefold aldehyde mixture. *Brain Res* 1969;15:395–412
27. Emery JL. Deformity of the aqueduct of Sylvius in children with hydrocephalus and myelomeningocele. *Dev Med Child Neurol* 1974;16(6 Suppl 32):40–48
28. Koo H, Chi JG. Congenital hydrocephalus-analysis of 49 cases. *J Korean Med Sci* 1991;6:287–98
29. Peach B. The Arnold-Chiari malformation. *Arch Neurol* 1965;12:527–35
30. Cinalli G, Spennato P, Del Basso-De Caro ML, et al. Hydrocephalus and Dandy Walker malformation. In: Cinalli C, Maixner WJ, Sainte-Rose C, eds. *Pediatric Hydrocephalus*. Milan, Italy: Springer-Verlag, 2004:259–77
31. Nielsen LA, Maroun LL, Broholm H, et al. Neural tube defects and associated anomalies in a fetal and perinatal autopsy series. *APMIS* 2006;114:239–46
32. Jacobsen M. *Developmental neurobiology*. New York, NY: Plenum, 1991
33. Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, et al. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol* 2003;69:49–69
34. Mori T, Buffo A, Gotz M. The novel roles of glial cells revisited: The contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2005;69:67–99
35. Kazanis I. The subependymal zone neurogenic niche: A beating heart in the centre of the brain: How plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed. *Brain* 2009;132:2909–21
36. Spassky N, Merkle FT, Flames N, et al. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 2005;25:10–18
37. Samat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 1992;8:163–78
38. Samat HB. Regional differentiation of the human fetal ependyma: Immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:58–75
39. Bonfanti L, Peretto P. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol* 2007;83:24–36
40. Nojima Y, Enzan H, Hayashi Y, et al. Neuroepithelial and ependymal changes in HTx rats with congenital hydrocephalus: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Pathol Int* 1998;48:115–25
41. Chae TH, Kim S, Marz KE, et al. The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 2004;36:264–70
42. Bátiz LF, Páez P, Jiménez AJ, et al. Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the *hyh* mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 2006;23:152–68
43. Klezovitch O, Fernandez TE, Tapscott SJ, et al. Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in *Lgl1* knockout mice. *Genes Dev* 2004;18:559–71
44. Imai F, Akimoto K, Koyama H, et al. Inactivation of aPKC λ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 2006;133:1735–44
45. Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 2007;18:2305–12
46. Rasin M, Gazula V, Breunig J, et al. Numb and *Numbl* are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci* 2007;10:819–27
47. Kadowaki M, Nakamura S, Machon O, et al. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev Biol* 2007;304:22–33
48. Shaw RF, Fay AJ, Puthenveedu M, et al. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 2007;128:547–60
49. Yung YC, Mutoh T, Lin ME, et al. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med* 2011;3:99ra87
50. Shim JW, Sandlund J, Han CH, et al. VEGF, which is elevated in the CSF of patients with hydrocephalus, causes ventriculomegaly and ependymal changes in rats. *Exp Neurol* 2013;247:703–9
51. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008;5:10
52. Vio K, Rodríguez S, Yulis CR, et al. The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008;5:3
53. Mashayekhi F, Draper CE, Bannister CM, et al. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: A role for CSF. *Brain* 2002;125(Pt 8):1859–74
54. Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: A vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:317–28
55. Nabuni M, Rasouli J, Parivar K, et al. In vitro effects of fetal rat cerebrospinal fluid on viability and neuronal differentiation of PC12 cells. *Fluids Barriers CNS* 2012;9:8
56. Nechiporuk T, Fernández TE, Vasioukhin V. Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in *Dlg5*^{-/-} mice. *Dev Cell* 2007;13:338–50
57. Guerrini R, Barba C. Malformations of cortical development and aberrant cortical networks: Epileptogenesis and functional organization. *J Clin Neurophysiol* 2010;27:372–79
58. Sato O, Yamguchi T, Kittaka M, et al. Hydrocephalus and epilepsy. *Childs Nerv Syst* 2001;17:76–86
59. Vinchon M, Rekate H, Kulkarni AV. Pediatric hydrocephalus outcomes: A review. *Fluids Barriers CNS* 2012;9:18
60. Le Magueresse C, Alfonso J, Bark C, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts use vasculature as a scaffold to migrate radially to the cortex in neonatal mice. *Cereb Cortex* 2012;22:2285–96
61. Boveviti S, Hsieh YC, Bovolin P, et al. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 2007;27:5976–80
62. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 2009;88:41–63
63. Thored P, Wood J, Arvidsson A, et al. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 2007;38:3032–39
64. Yamashita T, Ninomiya M, Hernández-Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006;26:6627–36
65. Krueger RC, Wu H, Zandian M, et al. Neural progenitors populate the cerebrospinal fluid of preterm patients with hydrocephalus. *J Pediatr* 2006;148:337–40
66. Ponti G, Obernier K, Guinto C, et al. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *PNAS* 2013;110:1045–54
67. Guerra M. Neural stem cells: Are they the hope of a better life for patients with fetal-onset hydrocephalus? *Fluids Barriers CNS* 2014;11:7
68. Del Bigio MR. Pathophysiologic consequences of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am* 2001;12:639–49
69. Williams MA, McAllister JP, Walker ML, et al. Priorities for hydrocephalus research: Report from a National Institutes of Health-sponsored workshop. *J Neurosci* 2007;107:345–57

Downloaded from <http://jnen.oxfordjournals.org/> by guest on January 24, 2016

