

Uretroplastía con cubierta de epidermis cultivada Estudio experimental en perros

Dr. Francisco Garibay-González²

Dr. Roberto Arroyo López¹

Dr. Mario Navarrete-Arellano³

Institución donde se llevó a cabo la investigación:

Hospital Central Militar, Periférico esquina con Ejército Nacional Mexicano, s/n,
Colonia Lomas de Sotelo, Delegación Miguel Hidalgo. Código Postal 11200.
México. D.F.

1Cirujano Pediatra, Jefe de Cirugía Pediátrica,

Centro de Rehabilitación Infantil, Campo Mil. No. 1-A.

2Cirujano Urólogo Pediatra, Adscrito al servicio de Cirugía Pediátrica,

Hospital Central Militar, México, D.F.

3Cirujano Pediatra, Jefe del Curso de Especialidad y Residencia en Cirugía Pediátrica,

Hospital Central Militar, México, D.F.

Solicitud de sobretiros: Tte. Cor. M.C. Francisco Garibay-González

Hospital Central Militar (Pediatria Quirúrgica)

Bld. Manuel Ávila Camacho S/N, esquina con General Cabral

Lomas de Sotelo, D.F., C.P. 11649

Email: pacog25@yahoo.com

Resumen

Introducción: El hipospadias es una de las malformaciones congénitas más frecuentes 30 a 39.7/10,000 nacidos vivos. La uretroplastía para la corrección de hipospadias, continúa representando un reto. Las complicaciones postoperatorias (estenosis, divertículo y/o fístula) son frecuentes, independientemente de la técnica quirúrgica utilizada, siendo la fístula uretrocutánea la más frecuente.

Planteamiento del problema: El uso de epidermis cultivada potencialmente puede disminuir la incidencia de complicaciones postoperatorias en la uretroplastía.

Objetivo: Demostrar que el uso de epidermis cultivada disminuye el número de complicaciones postoperatorias en la uretroplastía en perros.



Material y Métodos: Estudio experimental, comparativo en 20 perros. Grupo control con uretroplastía con técnica de Snodgrass (A, n=10) y grupo experimental (B, n=10) uretroplastía y colocación de parche de tejido de epidermis cultivada. Se compararon las siguientes variables: inflamación, fibrosis, epitelización y complicaciones.

Resultados: En el grupo A se presentaron 3 fístulas (30%) y ninguna en el grupo B. La estenosis se presentó solo en un perro (10%) del grupo A y no se presentaron divertículos en ninguno de los grupos. El total de complicaciones fue menor en el grupo B ($p=0.0253$). No se demostró diferencia en cuanto al grado de inflamación, fibrosis y epitelización ($p>0.05$).

Conclusiones: No se presentaron complicaciones postoperatorias con el uso del injerto de epidermis cultivada y su uso en esta técnica parece seguro en el grupo animal estudiado.

C Palabras clave: hipospadias, uretroplastía, epidermis cultivada, piel cultivada

Urethroplasty with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes Experimental study in dogs

Abstract

Introduction: Hypospadias is one of the most common congenital malformations. (30 a 39.7/10,000 newborns). Urethroplasty for correction of hypospadias is still a challenge. No matter surgical technique, postoperative complications (stenosis, diverticulum and fistula) are frequent. Urethrocuteaneous fistula is the most common.

Potentially, urethroplasty postoperative complications could be lower using frozen epidermal sheets.

Objective: To show that frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes could decrease urethroplasty postoperative complications in an experimental dog model.

Material and Methods: Experimental, comparative study in 20 dogs. Control group: Snodgrass urethroplasty technique (A, n=10) and experimental group (B, n= 10), urethroplasty with cover of human epidermal keratinocytes. Variables were: inflammation, fibrosis, ephitelization and complications.

Results: There were 3 fistulas in group A (30%) and no one in group B. Stenosis was present in one dog of group A (10%) and there were no diverticulum in both groups. Group B showed less number of total complications ($p=0.0253$). We could not probe any difference in inflammation, fibrosis and ephitelization ($p>0.05$).

Conclusions: There were no postoperative complications with the use of frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes; its use in urethroplasty technique seems to be safe in the studied animal group.

Index words: hypospadias, urethroplasty, frozen cultured sheets, human epidermal keratinocytes.

Introducción

El hipospadias es una malformación congénita frecuente encontrada en aproximadamente 1 de cada 250 recién nacidos vivos o hasta 1 en 125 recién nacidos masculinos.¹

En el hipospadias existe una alteración en el desarrollo normal de la uretra, piel y aspectos ventrales del pene lo que conlleva a una serie de anomalías en el cual el meato urinario puede encontrarse en cualquier sitio a lo largo

del cuerpo del pene en su porción ventral, en el escroto o hasta en el periné.²

Independientemente de la técnica quirúrgica en la reparación del hipospadias, los objetivos de cualquiera de éstas son la reconstrucción de un pene recto con un meato tan cerca como sea posible del sitio normal, así como permitir un chorro de orina recto y una relación sexual normal con una imagen cónica, simétrica y estéticamente normal.³



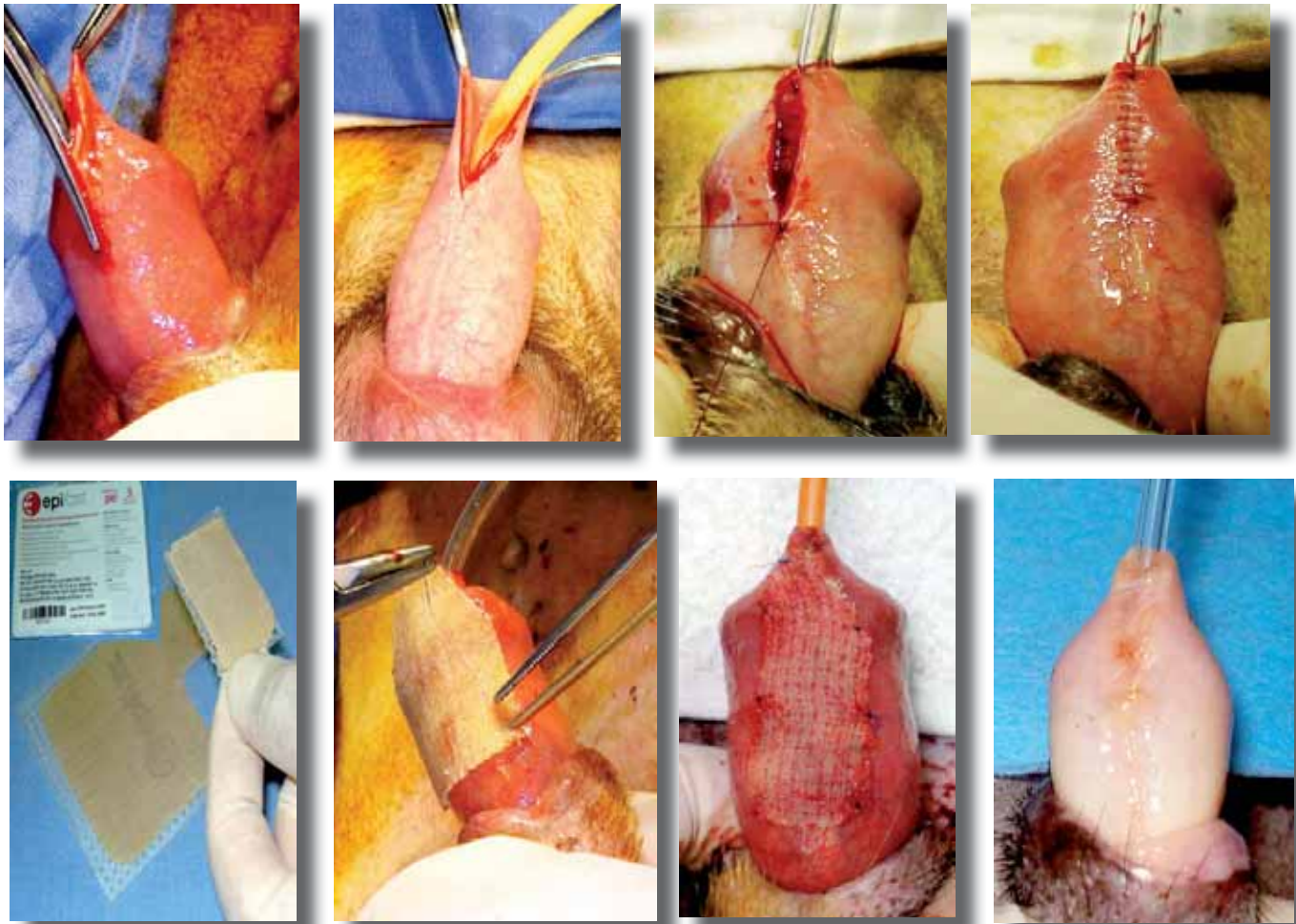


Figura 1. Técnica quirúrgica en el grupo A (Snodgrass modificado) y grupo experimental (B) con epidermis cultivada

La técnica de Snodgrass se desarrolló por primera vez a principios de los 90's, teniendo su primera publicación en 1994.⁴

En ésta técnica los cambios más importantes son la incisión de la placa uretral con tubularización y reparación secundaria agregándosele posteriormente una cubierta con dartos.

Después esta técnica se llevó a cabo de manera multicéntrica,⁵ así como para las hipospadias proximales obteniendo resultados satisfactorios.⁶⁻¹⁰

La incidencia de complicaciones varía con la forma particular de reparación. Dentro de las complicaciones que se pueden presentar están la fístula uretrocutánea, estenosis en el sitio de unión de la uretra nativa y la neouretra, estenosis del meato, divertículos, hemorragia, infección, colgajos cutáneos desvitalizados, curvatura persistente del pene, entre otras, siendo la fístula uretrocutánea la complicación más común a largo plazo y su incidencia ha sido el parámetro para evaluar la efectividad de las téc-

nicas quirúrgicas encontrándose en un 10-15% y es debida al fracaso de la cicatrización en algún punto a lo largo de la línea de sutura de la nueva uretra.⁸⁻¹¹

La estenosis del meato es causada por una falla en el diseño y aplicación de la técnica quirúrgica o por una pobre vascularización de la uretroplastía o glanduloplastía.

La estenosis es el resultado de problemas técnicos en el momento de la calibración de la uretra.¹

El cierre quirúrgico secundario debe de posponerse hasta la cicatrización completa del tejido, lo cual requiere al menos de seis meses.¹⁻³

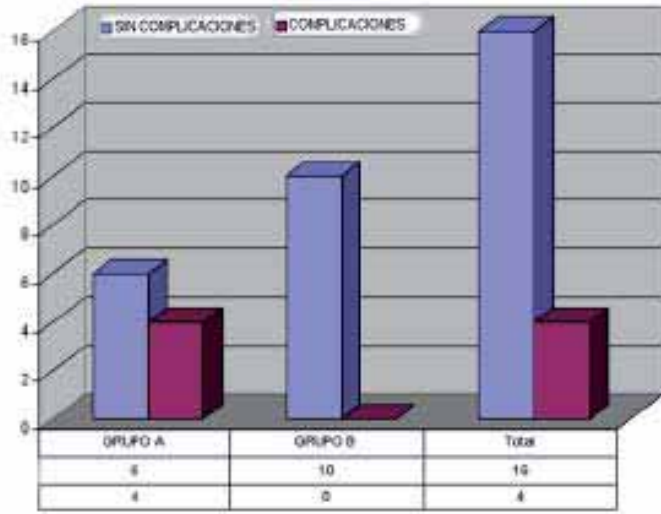
Una patología que requiere uretroplastía es el trauma de la uretra anterior, siendo la reparación quirúrgica y las complicaciones muy similares a la uretroplastía por hipospadias.²

El aloinjerto de epidermis humana cultivada in vitro es una cubierta biológica formada



Uretroplastia con cubierta de epidermis cultivada, estudio experimental en perros

Grafica 1. Presencia de complicaciones en la técnica convencional modificada (**grupo A**) vs uso de injerto cultivado (**grupo B**).



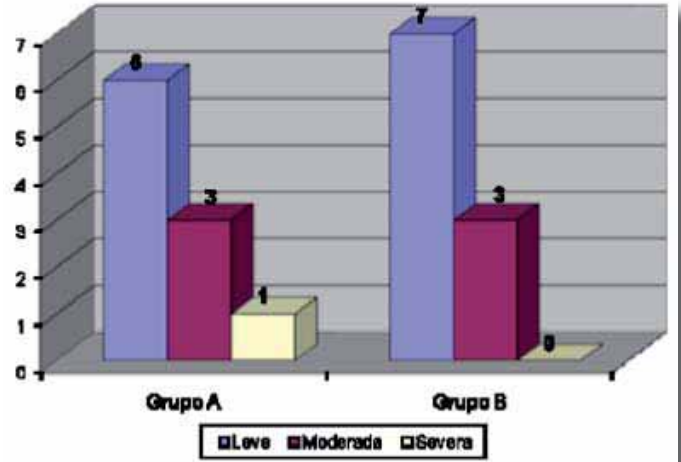
$P = 0.0253$ (Chi cuadrada)

por 4-5 capas de queratinocitos que ayuda a la piel a crecer más rápido cuando se aplica sobre una lesión por medio de la estimulación de los factores de crecimiento, libre de agentes patógenos infecciosos,^{12,13,14} cubierta y protegida por una gasa vaselinada de 56 cm² (7.0 x 8.0 cm) con registro sanitario ante la Secretaría de Salud 00054C2000.

En la literatura mundial se tienen reportes del uso de otros tejidos biológicos para la reparación de las hipospadias^{15,16} así como de esta misma técnica quirúrgica pero en diferentes modelos experimentales.¹⁷

En nuestro país no hay reportes del uso de este tejido biológico en uretroplastías.

Grafica 2. Grado de inflamación en la técnica convencional modificada (**grupo A**) vs. uso de injerto cultivado (**grupo B**).



$P = 0.6392$ (Chi cuadrada)

Se planteo en el presente trabajo comparar en un modelo experimental de lesión uretral (en perros) dos técnicas quirúrgicas: Snodgrass vs. uso de epidermis cultivada.

Material y Métodos

Estudio experimental y comparativo en el cual se emplearon 20 perros machos de raza criolla, el tamaño de la muestra se decidió de acuerdo a la disponibilidad del modelo experimental (perro) en el bioterio.

Los criterios de inclusión fueron perros machos, jóvenes de 2-5 años, con un peso entre 15-20 kg, clínicamente sanos y sin malformaciones urológicas visibles.

Se llevó a cabo en el bioterio y quirófano experimental del Hospital Central Militar

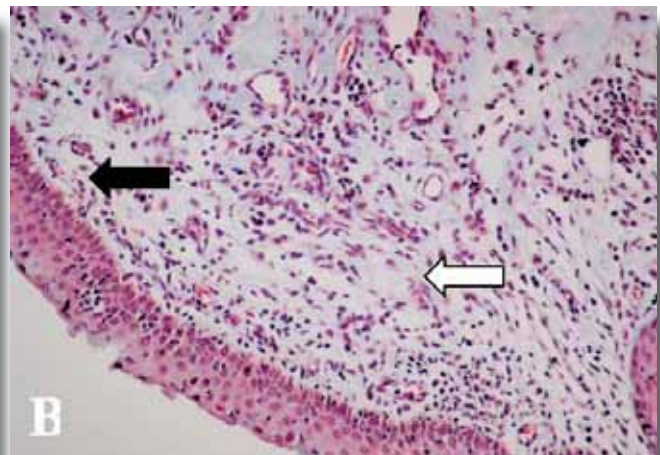
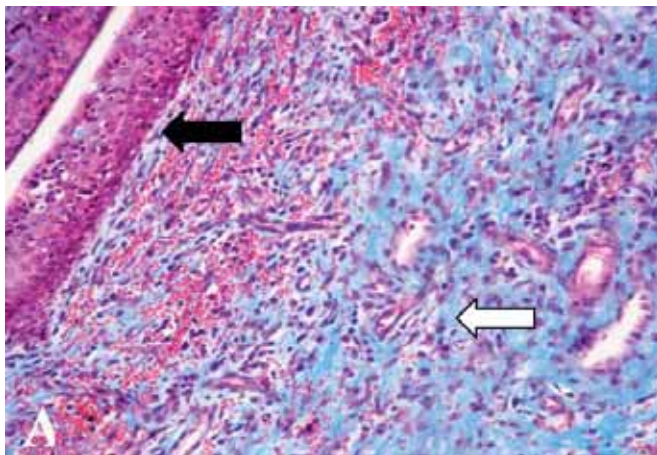


Figura 2. En 2-A se observa la fibrosis así como el aumento de colágena en el grupo experimental (flecha blanca), en 3-B se observa fibrosis leve en el grupo experimental, ambos con tinción de Masson a 40x. La flecha negra indica el epitelio uretral.



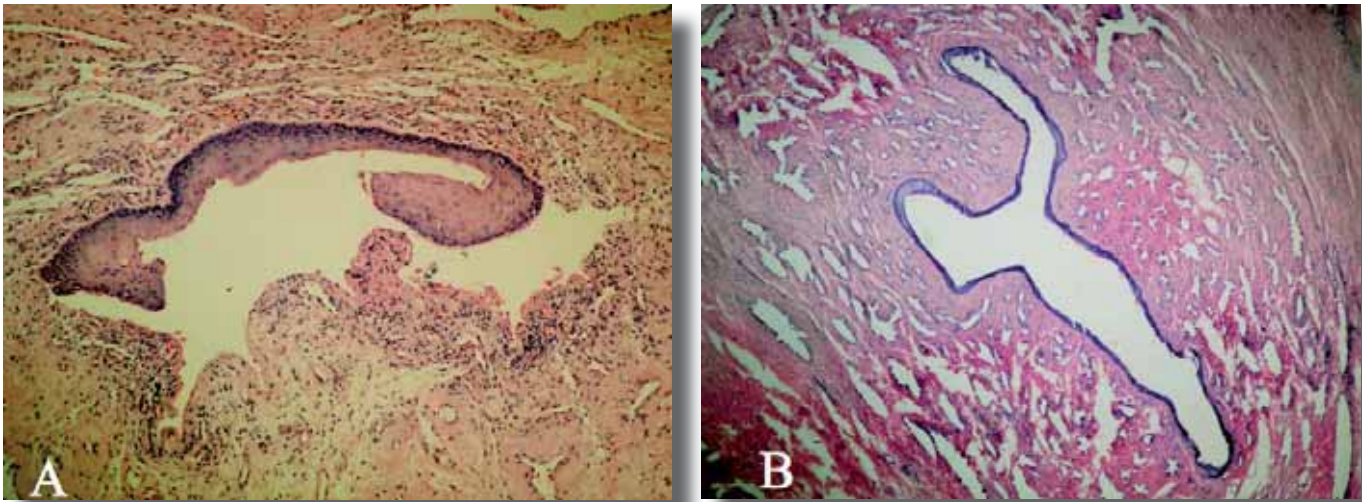


Figura 3. En 3-A se muestra la falta de epitelizeción en el 50% de la circunferencia de la uretra en un perro del grupo A con tinción de hematoxilina eosina a 10x. En 4-B se observa un aspecto postoperatorio de un perro con epitelizeción completa del grupo B con tinción de hematoxilina eosina 4x (B).

realizándose de enero a junio del 2008.

Las variables estudiadas fueron la presencia o ausencia de fístulas, divertículos, estenosis y grado de Inflamación periuretral, fibrosis y epitelizeción.

La preparación y cuidado de un modelo experimental (canino), se llevó a cabo conforme a la NOM-062-ZOO-1999.^{18,19}

Se realizó examen clínico, baño ectoparasitocida (coumaphos) a razón de 2ml por cada 15 L de agua para un perro de 20kg promedio, se les dio tratamiento endoparasitocida con prazicuantel, febantel y pamoato de pirantel (340mg por cada 10kg de peso) y refuerzo vacunal que incluyó vacuna múltiple contra hepatitis, leptospirosis, parvovirus, distemper, y coronavirus y refuerzo antirrábico

Se mantuvieron en cuarentena por 2 semanas y fueron alimentados con croquetas (alimento comercial) alojándose en jaulas individuales de 1m x 2m bajo techo, cuidados por el personal de Veterinaria pertenecientes al Bioterio del Hospital Central Militar.

Los xenoinjertos de epidermis humana cultivada in vitro de marca comercial epifast[®] se obtuvieron de la empresa BIOSKINCO.

Intervención quirúrgica (resección uretral y uretroplastía)

Se bañó con shampoo medicado, rasurado del área a intervenir, tranquilización con propionil promazina 0.2mg/kg intramuscular, canalización, anestesia general con pentobarbital sódico 20mg/kg intravenoso e Intubación en-

dotraqueal y aplicación por vía subcutánea de sulfato de atropina 0.02mg/kg.

Preparación del área (asepsia y antisepsia). Se retrae el prepucio dejándose completamente desnudo el pene, se realiza sección de 2 cm de longitud desde el meato urinario y corte ventral y proximal del 30% de la circunferencia de uretra.

Se dividieron en 2 grupos iguales: en el grupo **A** se realizó neouretra con técnica de Snodgrass⁴ modificada y en el grupo **B** (experimental) se llevó a cabo la reparación con la misma técnica quirúrgica y colocación de xenoinjerto, epidermis humana cultivada in vitro sin colocarse colgajo de dartos modificándose de ésta manera la técnica original.

En ambos grupos la reparación fue con vicryl 6-0 aguja no cortante y la fijación del parche fue con PDS II 6-0 dejando sonda urinaria 10 Fr por 1 semana, antibiótico terapéutico cefadroxilo a 20mg/kg y analgésico meglumina de flumixin (0.3mg/kg/día) cada 24 horas dosis única subcutánea o intravenosa por 7 días.

En el postoperatorio inmediato (4 horas) se manejaron líquidos de mantenimiento, control de la temperatura con medios físicos externos e iniciándose la vía oral al término de éste tiempo y cuando las condiciones del animal fueron las adecuadas.

El seguimiento del animal fue por 1 mes llevándose un registro de los resultados en las hojas de recolección de datos.



Valoración de los resultados

Se llevó a cabo estudio macroscópico para valorar presencia de fístula uretrocutánea y la estenosis al no poder pasar una sonda del mismo calibre que la colocada en el transoperatorio, menor a 10Fr.

Se hizo uretrografía retrógrada con medio de contraste radiográfico no iónico (Iopamiron 300) utilizando aparato marca Siemens polimobil 2 para valorar la permeabilidad de la uretra o divertículos, en los que se presentó fístula uretrocutánea no se realizó la misma.

Se tomaron dos muestras del sitio de la lesión del pene las cuales fueron procesadas con la técnica histológica para bloques de parafina, obteniéndose dos cortes de 3 micras de espesor, uno de los cortes se tiñó con la técnica de hematoxilina y eosina y otro con la técnica de Masson para valoración específica de la fibrosis.

Se observó con un microscopio óptico la reacción inflamatoria y la concentración de colágena (fibrosis) clasificándolas en leve, moderada y severa así como el porcentaje de epitelización.

La inflamación y la fibrosis se clasificaron como leve, moderada y severa utilizando como método estadístico la x2. El grado de epitelización se midió por porcentaje y la prueba estadística utilizada fue x2.

Resultados

Se operaron un total de 20 perros. 10 perros en el grupo control (A) con técnica de Snodgrass modificada y 10 en el grupo experimental (B) con técnica de Snodgrass modificada más parche de epidermis cultivada humana.

No se eliminó a ningún perro por problemas ajenos a la investigación (enfermedad sistémica, diarrea o respiratoria, o muerte) y no se tuvieron incidentes en el transoperatorio.

El rango de estancia de la sonda urinaria fue de 3 a 10 días (promedio 6 días)

En el grupo control (A) se presentaron fístulas en 3 (30%) y en ninguno del grupo experimental (B). La estenosis se presentó solo en un perro (10%) del grupo A y no se presentaron divertículos en ninguno de los grupos. Al utilizar la prueba de Chi cuadrada encontramos diferencia significativa para el total de complicaciones entre ambos grupos ($p=0.0253$). (Gráfica 1)

Los resultados de la inflamación periuretral se muestran en la Gráfica 2. No hubo diferencia

entre ambos grupos y predominando la inflamación leve. ($p > 0.05$).

En el grupo A se presentó fibrosis leve en 7, moderada en 3 y severa en ninguno y en el grupo B no se presentó fibrosis en 2 perros y leve en 8, sin observar fibrosis moderada o severa. (Figura 2).

En cuanto a la epitelización fue adecuada en 8 perros (80%) en el grupo A vs. 9 perros (90%) en el grupo B. No se encontró diferencia significativa entre ambos grupos. ($P = 0.5560$, 95% CI: -22.51 a 12.51). (Figura 3)

Discusión

La uretroplastía continúa representando un reto para el cirujano independientemente de su etiología (hipospadias o trauma)¹

Existen múltiples técnicas para la formación de una neouretra, incluyendo la técnica descrita por Snodgrass, la cual ha ganado aceptación en la última década.⁴

Las complicaciones postoperatorias de la uretroplastía (estenosis, divertículo y/o fístula de la neouretra) son múltiples, independientemente de la técnica quirúrgica utilizada siendo la fístula uretrocutánea el evento adverso más frecuente.²

En la literatura mundial son escasos los reportes que estudian el mecanismo de epitelización en la uretroplastía.¹

Dado el alto índice de complicaciones, se han descrito numerosas modificaciones a las técnicas tradicionales para la uretroplastía.

Hasta nuestro conocimiento no se han reportado estudios experimentales (tanto en animales como en humanos) con el uso de epidermis cultivada en la uretroplastía.

Se utilizó en este estudio epidermis humana cultivada in vitro (epifast[®]) como una tercera capa a la uretroplastía realizada previamente en dos capas con la técnica de Snodgrass modificada.

En el grupo A (técnica convencional modificada) se presentó un mayor número de complicaciones, que aunque individualmente no mostraron diferencia estadística, al considerarlas en su totalidad si hubo diferencia y posiblemente esto tenga aun mayor relevancia en la clínica.

Se presentaron fístulas en el 30% del grupo A lo cual es compatible con lo escrito en la literatura

En 10% del grupo A se presentó estenosis del meato y ninguno del grupo B, cifra por de-



bajo de los reportado en la literatura para las uretroplastías debido posiblemente a la mayor vascularidad de la uretra del perro en relación al humano.¹⁸⁻²⁰

El estudio histopatológico de ambos grupos no mostró diferencia significativa en cuanto al grado de inflamación y epitelización, en cuanto a la fibrosis esta se presentó únicamente de manera leve en el grupo experimental.

Es interesante que en este estudio la respuesta inflamatoria fuera mínima en ambos grupos, a diferencia del estudio por Bleustein y colaboradores²⁰ en el cual estudiaron la histopatología en 5 perros a los cuales se les realizó la técnica convencional de Snodgrass.

En mencionado estudio concluyeron que la regeneración en la uretroplastia fue por epitelización en el dorso de la uretra con tejido celular normal y en el sitio de la anastomosis por una reacción desmoplástica e inflamatoria.

En el presente trabajo el uso de epidermis humana cultivada in vitro (epifast[®]) mostró una tendencia a menores complicaciones, pues en los perros estudiados del grupo experimental no encontramos fístulas, estenosis ni divertículos, mostrando grados de epitelización completos, inflamación leve sin mostrar reacción de fibrosis importante.

Dentro del armamentario terapéutico para pacientes con hipospadias, se sugiere el uso de epidermis con piel cultivada.

Acorde a los resultados de este estudio, en el grupo experimental en el que se utilizó epidermis cultivada no se presentaron complicaciones.

Consideramos que este producto puede ser utilizado en pacientes con hipospadias severa en los cuales no se cuenta con suficiente piel para cubrir el defecto o bien como una cubierta más para la uretroplastia tanto en hipospadias como en lesiones uretrales de cualquier etiología

Por otra parte creemos que pudiera tener utilidad para prevenir las complicaciones posoperatorias más comunes de la uretroplastia (fístula uretrocutánea, estenosis, divertículos) o bien para el manejo una vez que se presenten las mismas.

Conclusiones

No se encontró diferencia estadística entre el grupo control y el experimental (xenoinjerto de epidermis humana cultivada in vitro) en forma individual en cuanto al diámetro uretral postoperatorio, presencia de fístulas, divertículos, estenosis, inflamación y espichártenos.

El grupo control presentó más complicaciones que el grupo experimental al considerar el total de estas (fístulas más estenosis).

No se presentaron complicaciones con el uso del xenoinjerto epidermis humana cultivada in vitro y su uso en esta técnica parece seguro en el grupo animal estudiado.

Se recomienda continuar esta línea de investigación para poder aplicar esta técnica con seguridad en nuestros pacientes.

Referencias

1. Baskin L.S: Hypospadias. Pediatric Surgery, sexta edición. Philadelphia, Mosby Elsevier, 2006: 1870-1898.
2. Pinkstaff D. Noseworthy J. Hypospadias: Principles and practice of Pediatric surgery, primera edición. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005:1611-1619.
3. Murphy, JP: Hypospadias. Pediatric Surgery, cuarta edición. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005: 807-825.
4. Snodgrass, W: Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias, J Urol 1994; 151:464-465.
5. Snodgrass, W., Koyle M., Manzoni.,: Tubularized incised plate hypospadias repair: Results of a multicenter experience. J Urol 1996; 156:839-841.
6. Snodgrass, W, Koyle M, and Manzoni G.: Tubularized incised plate hypospadias repair for proximal hypospadias. J Urol 1998; 159: 2129-2131.
7. Snodgrass, W: Tubularized incised plate hypospadias repair: Indications, technique and complications. Urology 1999; 54:6-11.
8. Snodgrass, W: Assessing outcomes of hypospadias surgery. J Urol 2005; 174:816-817.
9. Snodgrass, W., Yucel S.: Tubular Incised plate for mid shaft and proximal hypospadias repair. J Urol 2007; 177:698-702.
10. Snodgrass, W: Utilization of urethral plate in hypospadias surgery. Indian J Urol 2008; 24:195-199.
11. Venkata RJ: The modified Snodgrass hypospadias repair: reducing the risk of fistula and meatal stenosis. J Urol 2003; 170:1603-1605.
12. Tamariz E., Marsch M., Castro F: Frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes enhance healing of full-thickness wounds in mice. Cell Tissue Res 1999; 296: 575-585



13. Tamariz E., Castro F., Kuri W.: Growth factors and extracellular matrix proteins during wound healing promoted with frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 79-89

14. Kuri W: La epidermis humana cultivada in vitro para el tratamiento de quemaduras. *Gac Med Mex* 1997; 133: 571-576.

15. Foinquinos R., Calado A., Janio R.: The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: initial experience. *International Braz J Urol* 2007; 33: 523-531.

16. Fichtner J., Fisch M., and Filipas D.: Refinements in buccal mucosal graft urethroplasty for hypospadias repair. *World J Urol* 1998;16: 192-194.

17. Genc A, Taneli C, and Guns C: Histopathological evaluation of the urethra after the Snodgrass operation: An experimental study in rabbits. *BJU International* 2002; 90:950-952.

18. De Aluja: Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana. *Gac Med Mex* 2002; 138: Gac Med Mex 2002; 138: 295-298

19. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del día 22 de Agosto del 2001.

20. Bleustein C., Esposito M., Soslow R.: Mechanism of healing following the Snodgrass repair. *J Urol* 2001; 165:277-279.

