

Uretroplastia con cubierta de epidermis cultivada, estudio experimental en perros

Tte. Cor. M.C. Francisco **Garibay-González,***

Mayor M.C. Roberto **Arroyo-López,**** Tte. Cor. M.C. Mario **Navarrete-Arellano*****

Hospital Central Militar, México, D.F.

RESUMEN

Introducción. El hipospadias es una de las malformaciones congénitas más frecuentes 30 a 39.7/10,000 nacidos vivos. La uretroplastia 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. Hipótesis: El uso de epidermis cultivada potencialmente puede disminuir la incidencia de complicaciones postoperatorias en la uretroplastia.

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

Material y métodos. Estudio experimental, comparativo en 20 perros. Grupo control con uretroplastia con técnica de Snodgrass (A, n = 10) y grupo experimental (B, n = 10) uretroplastia 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 tres fístulas (30%) y ninguna en el grupo B. La estenosis se presentó sólo 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.

Palabras clave: hipospadias, uretroplastia, epidermis cultivada, piel cultivada.

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

SUMMARY

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. Hypothesis: 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 three 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.

Key words: Hypospadias, urethroplasty, frozen cultured sheets, human epidermal keratinocytes.

* Cirujano Urólogo Pediatra, adscrito al Servicio de Cirugía Pediátrica, Hospital Central Militar. ** Cirujano Pediatra, adscrito al Centro de Rehabilitación Infantil, Campo Mil. No. 1-A. *** Cirujano Pediatra, Jefe del Curso de Especialización y Residencia en Cirugía Pediátrica, Hospital Central Militar.

Correspondencia:

Dr. Francisco Garibay-González

Hospital Central Militar (Pediatria Quirúrgica). Blvd. Manuel Ávila Camacho s/n, esquina con General Cabral, Col. Lomas de Sotelo, 11649, México, D.F. Tel.: 5557-3100, Exts. 1242 y 1630. Correo electrónico: pacog25@yahoo.com

Recibido: Junio 23, 2009.

Aceptado: Septiembre 9, 2009.

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 las cuales 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

La técnica de Snodgrass se desarrolló por primera vez a principios de los 90, teniendo su primera publicación en 1994.⁴ En esta 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 técnicas quirúrgicas encontrándose en 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 uretroplastia o glanduloplastia.

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 uretroplastia es el trauma de la uretra anterior, siendo la reparación quirúrgica y las complicaciones muy similares a la uretroplastia por hipospadias.²

El aloinjerto de epidermis humana cultivada *in vitro* es una cubierta biológica formada 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,¹²⁻¹⁴ cubierta y protegida por una gasa vaselinada de 56 cm² (7.0 x 8.0 cm) con registro sanitario ante la Secretaría de Salud 00054X2000.

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 uretroplastias.

Se planteó 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 con 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 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 epitelización. 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 2 mL por cada 15 L de agua para un perro de 20 kg promedio; se les dio tratamiento endoparasitocida con prazicuantel, febantel y pamoato de pirantel (340 mg por cada 10 kg de peso) y refuerzo vacunal que incluyó vacuna múltiple contra hepatitis, leptospirosis, parvovirus, distemper y coronavirus y refuerzo antirrábico.

Se mantuvieron en cuarentena por dos semanas y fueron alimentados con croquetas (alimento comercial) alojándose en jaulas individuales de 1 x 2 m 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 uretroplastia)

Se bañó con shampoo medicado, rasurado del área a intervenir, tranquilización con propionil promazina 0.2 mg/kg intramuscular, canalización, anestesia general con pentobarbital sódico 20 mg/kg intravenoso e intubación endotraqueal y aplicación por vía subcutánea de sulfato de atropina 0.02 mg/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 de 30% de la circunferencia de uretra, se dividieron en dos 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 esta 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 una semana, antibiótico terapéutico cefadroxilo a 20 mg/kg y analgésico meglumina de flumixin (0.3 mg/kg/día) cada 24 horas dosis única subcutánea o intravenosa por siete días.

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

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

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 10 Fr.

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 tres 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.

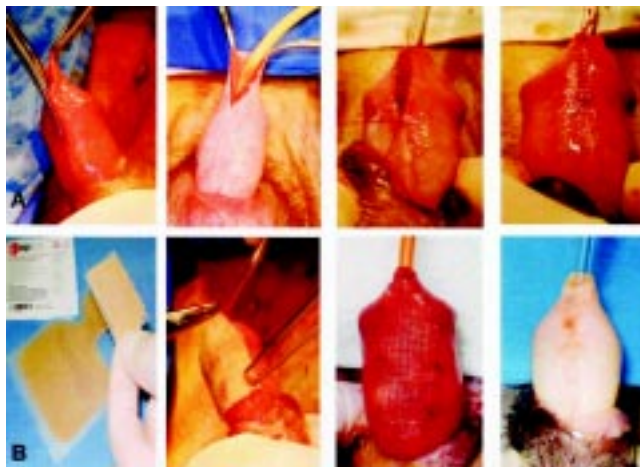


Figura 1. Técnica quirúrgica en el grupo A (Snodgrass modificado) y grupo experimental (B) con epidermis cultivada.

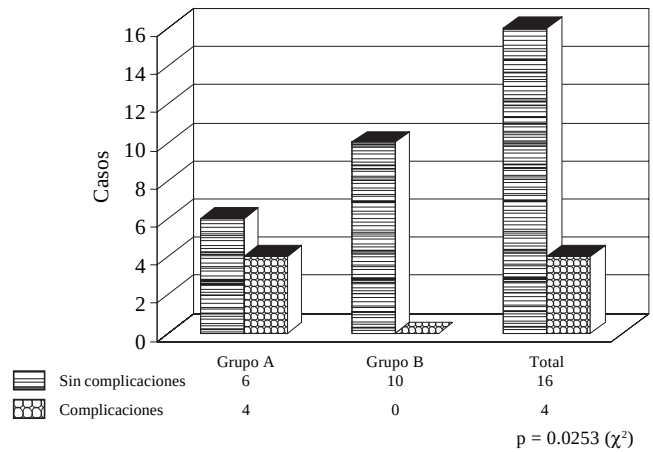


Figura 2. Presencia de complicaciones en la técnica convencional modificada (grupo A) vs. uso de injerto cultivado (grupo B).

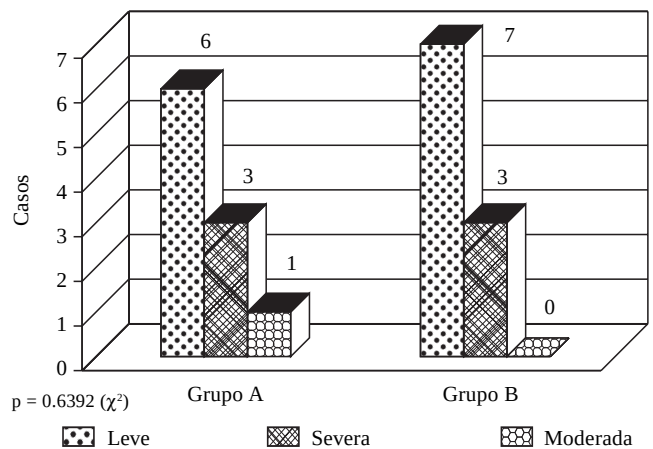


Figura 3. Grado de inflamación en la técnica convencional modificada (grupo A) vs. uso de injerto cultivado (grupo B).

La inflamación y la fibrosis se clasificaron como leve, moderada y severa utilizando como método estadístico la χ^2 . El grado de epitelización se midió por porcentaje y la prueba estadística utilizada fue χ^2 .

Resultados

Se operó 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, diarreica o respiratoria, o muerte) y no se tuvieron incidentes en el transoperatorio.

El rango de estancia de la sonda urinaria fue de tres a 10 días (promedio seis días).

En el grupo control (A) se presentaron fístulas en tres (30%) y en ninguno del grupo experimental (B). La estenosis se presentó sólo en un perro (10%) del grupo A y no se presentaron divertículos en ninguno de los grupos. Al utili-

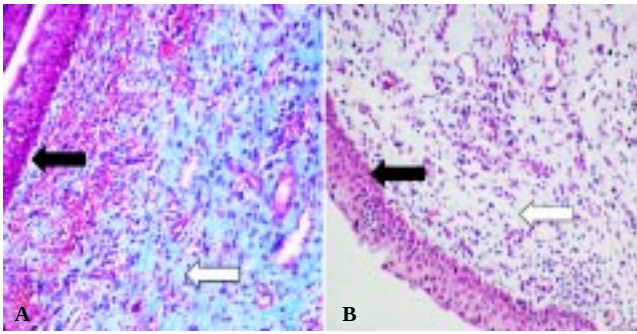


Figura 4. A) Se observa fibrosis moderada, así como el aumento de colágena en el grupo control A (flecha blanca). B) Se observa fibrosis leve en el grupo experimental B, ambos con tinción de Masson a 40x. La flecha negra indica el epitelio uretral.

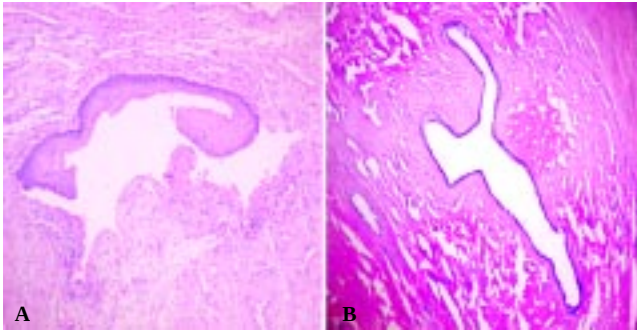


Figura 5. A) Muestra la falta de epitelizeación en 50% de la circunferencia de la uretra en un perro del grupo A con tinción de hematoxilina-eosina a 10x. B) Se observa un aspecto postoperatorio de un perro con epitelizeación completa del grupo B con tinción de hematoxilina-eosina 4x.

zar la prueba de χ^2 encontramos diferencia significativa para el total de complicaciones entre ambos grupos ($p = 0.0253$) (Figura 2).

Los resultados de la inflamación periuretral se muestran en la figura 3. No hubo diferencia entre ambos grupos y predominando la inflamación leve ($p > 0.05$).

En el grupo A se presentó fibrosis leve en siete, moderada en tres y severa en ninguno y en el grupo B no se presentó fibrosis en dos perros y leve en ocho, sin observar fibrosis moderada o severa. (Figura 4).

En cuanto a la epitelizeación fue adecuada en ocho perros (80%) en el grupo A vs. nueve perros (90%) en el grupo B. No se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($P = 0.5560$, 95% CI: -22.51-12.51) (Figura 5).

Discusión

La uretroplastia 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 uretroplastia (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 epitelizeación en la uretroplastia.¹

Dado el alto índice de complicaciones, se han descrito numerosas modificaciones a las técnicas tradicionales para la uretroplastia. Hasta nuestro conocimiento no se han reportado estudios experimentales (tanto en animales como en humanos) con el uso de epidermis cultivada en la uretroplastia.

Se utilizó en este estudio epidermis humana cultivada *in vitro* (Epifast®) como una tercera capa a la uretroplastia 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 sí hubo diferencia y posiblemente esto tenga aún mayor relevancia en la clínica.

Se presentaron fístulas en 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 debajo de lo reportado en la literatura para las uretroplastias 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 epitelizeación, en cuanto a la fibrosis ésta 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 cols.²⁰ en el cual estudiaron la histopatología en cinco perros a los cuales se les realizó la técnica convencional de Snodgrass. En mencionado estudio concluyeron que la regeneración en la uretroplastia fue por re-epitelizeación 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 epitelizeación 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 con 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 postoperatorias 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 epitelización.

El grupo control presentó más complicaciones que el grupo experimental al considerar el total de éstas (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 LS. Hypospadias. Pediatric Surgery. 6th Ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier; 2006, p. 1870-98.
2. Pinkstaff D, Noseworthy J. Hypospadias: Principles and practice of Pediatric Surgery. 1st Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, p. 1611-9.
3. Murphy JP. Hypospadias. Pediatric Surgery. 4th Ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2005, p. 807-25.
4. Snodgrass W. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. J Urol 1994; 151: 464-5.
5. Snodgrass W, Koyle M, Manzoni G. Tubularized incised plate hypospadias repair: Results of a multicenter experience. J Urol 1996; 156: 839-41.
6. Snodgrass W, Koyle M, Manzoni G. Tubularized incised plate hypospadias repair for proximal hypospadias. J Urol 1998; 159: 2129-31.
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: 816-7.
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: 195-9.
11. Venkata RJ. The modified Snodgrass hypospadias repair: reducing the risk of fistula and meatal stenosis. J Urol 2003; 170: 1603-5.
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: 575-85.
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: 571-6.
15. Foinquinos R, Calado A, Janio R. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: initial experience. International Braz J Urol 2007; 33: 523-31.
16. Fichtner J, Fisch M, Filipas D. Refinements in buccal mucosal graft urethroplasty for hypospadias repair. World J Urol 1998; 16: 192-4.
17. Genc A, Taneli C, Guns C. Histopathological evaluation of the urethra after the Snodgrass operation: An experimental study in rabbits. BJU International 2002; 90: 950-2.
18. De Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana. Gac Med Mex 2002; 138: 295-8.
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: 277-9.

