

Cambios histológicos post uretroplastia utilizando submucosa de intestino delgado (SIS) porcina en conejos con uretra lesionada

Histologic changes after urethroplasty using small intestinal submucosa unseeded with cells in rabbits with injured urethra

Gustavo Villoldo^{1,3,4*}, Mónica Loresi³, Carlos Giudice¹, Oscar Damia¹, Juan Manuel Moldes², Francisco DeBadiola², Mariana Barbich³, Pablo Argibay³

¹Servicio de Urología del Hospital Italiano de Buenos Aires. ²Servicio de Uro-pediatría del Hospital Italiano de Buenos Aires. ³Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires (ICBME). ⁴Unidad de Regeneración Tisular en Urología (URTU).

Introducción: El objetivo de este trabajo es determinar si la submucosa de intestino delgado de cerdo (SIS) mantiene la misma capacidad regenerativa cuando la uretroplastia es realizada en uretras dañadas.

Materiales y métodos: Se utilizaron 30 conejos Nueva Zelanda, todos con lesión en la uretra péndula. Un mes posterior a la injuria uretral, todos los animales fueron randomizados y separados en dos grupos: 1) grupo control y 2) grupo uretroplastia. Los animales fueron sacrificados a las 2, 4, 12, 24 y 36 semanas luego de la última cirugía. Las uretras fueron extraídas para análisis histológico e inmunohistoquímico. Antes de sacrificarlos se les realizó uretrografía y cistoscopia a todos los animales.

Resultados: A las dos semanas se evidenció una monocapa continua de epitelio estratificado en ausencia de fibras musculares. Al mes, el epitelio no mostró cambios, con algunas fibras musculares correspondiendo a vasos de neoformación. Después de 3 meses aumentó la concentración de fibras musculares, sin modificación a los 6 ó 9 meses. La distribución fue irregular, con mayor concentración en los sitios de anastomosis y menor concentración en el centro del injerto.

Conclusiones: SIS promueve regeneración en uretras dañadas, donde se evidenció una demora en la epitelización y distribución anormal de las fibras musculares lisas. El daño uretral causado por los traumatismos interfiere con el proceso normal de cicatrización.

PALABRAS CLAVE: Regeneración uretral, estenosis de uretra, SIS.

Introduction: To determine whether small intestine submucosa has the same regenerative capacity when urethroplasty is performed in injured urethras.

Materials and methods: Our experiment was carried out in 30 New Zealand male rabbits, all of which had urethral injury. One month after the injury, all the animals were randomized into two groups: 1) a control group, 2) an onlay urethroplasty with SIS group. The animals were sacrificed 2, 4, 12, 24, and 36 weeks after urethroplasty, and their urethras were removed for histological and immunohistochemical examination. Before the scheduled sacrifice, urethrography and cystoscopy were performed.

Results: After 2 weeks, there was evidence of a continuous monolayer of stratified epithelial cells and absence of smooth muscle fibers. One month later, the epithelium showed no changes from the previously observed features but some smooth muscle fibers (representing newly formed vessels) became apparent. After 3 months, the graft showed increased concentration of smooth muscle fibers. After 6 and 9 months, the density of smooth muscle cells remained unchanged. Fiber arrangement was irregular, particularly at the anastomosis site. Epithelial and smooth muscle phenotypes were confirmed by immunohistochemistry using anti-pan-cytokeratin (AE1/AE3) antibodies and anti-alpha-smooth muscle actin, respectively.

Conclusions: SIS promotes regeneration in traumatized urethras, with slightly delayed epithelialization and abnormal distribution of smooth muscle. Urethral damage caused by trauma interferes with the normal healing process.

KEY WORDS: Urethral regeneration, urethral stenosis, SIS.

Correspondencia

Email: gustavo.villoldo@hospitalitaliano.org.ar
Email secundario: gvilloldo2012@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La reconstrucción de la uretra péndula masculina tanto para patología congénita como adquirida sigue siendo un reto para los urólogos. Más de 200 técnicas diferentes se han desarrollado para tratar hipospadias y estenosis uretrales, la mayoría utilizando piel de pene o prepucio^{1,2}. Se han documentado complicaciones relacionadas con estas técnicas quirúrgicas como crecimiento de pelos, estenosis, retracción de los injertos, divertículos en los colgajos y estenosis^{3,4,5,6,7}. Se han utilizado también mucosa bucal, vesical, túnica vaginalis, parches dérmicos, etc., tanto experimentalmente como en la práctica clínica^{8,9}. La utilización de tejidos no genitales provoca morbilidad en el sitio dador. Recientemente se ha descrito una matriz colágena xenogénica, no inmunogénica obtenida del intestino delgado del cerdo denominada submucosa de intestino de cerdo (SIS) que induce regeneración de varios tejidos en múltiples lugares¹⁰. El mecanismo exacto por el cual produce regeneración es desconocido, estando actualmente bajo investigación. SIS ha demostrado la regeneración de las tres capas de la vejiga en ratas y perros^{11,12}. Histológicamente, la respuesta del huésped a SIS es una reacción de cicatrización fibrovascular con neovascularización, infiltración inflamatoria, con fibroblastos y remodelación. Dado que fueron alentadores los resultados sobre regeneración vesical en animales, se probó con uretras de conejos obteniendo regeneración del epitelio y del músculo liso. Pero todos los estudios fueron realizados en animales sanos, en órganos que no tenían daño previo. Sin embargo, los pacientes candidatos a recibir una uretroplastia con injerto de SIS no tienen uretras normales. Por esta razón, el objetivo de este estudio en conejos es determinar si SIS mantiene la misma capacidad regenerativa cuando la uretroplastia se realiza en uretras enfermas o lesionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Un total de 30 conejos Nueva Zelanda, pesando entre 2,5 y 3,5 kg, durmiendo en celdas individuales a temperatura constante 17-18°C con 50-55% de humedad, 12 horas de ciclos luz/oscuridad, con libre acceso a comida y agua corriente. Luego de 2 semanas de cuarentena, los animales hicieron ayuno durante la noche anterior a la cirugía. La primera cirugía realizada a todos los animales consistió en una uretrotomía y cierre con sutura no reabsorbible para posterior identificación. Al mes de dicha cirugía, todos los animales fueron randomizados a grupo control (a los que no se les realizó nueva cirugía) o grupo "uretroplastia" (se les realizó una uretroplastia "onlay" utilizando SIS sin células sembradas sobre dicha matriz colágena).

Obtención de SIS: SIS fue obtenida según protocolo previamente publicado por el Dr. Badylak y colaboradores¹³ con algunas modificaciones. En resumen, el intestino delgado del cerdo es retirado dentro de los 10 minutos de la eutanasia del cerdo y colocados en solución fisiológica. Posteriormente son cortados en segmentos de 10-20 centímetros y el mesenterio es removido. Luego se lo corta siguiendo el borde mesentérico y se quita la capa externa seromuscular. El intestino se evierte y la capa mucosa se elimina utilizando gasas húmedas, dejando una fina membrana grisácea de 0,1 mm de espesor. Dicha membrana es posteriormente decelularizada utilizando Tritón X-100 al 0,5% + Azida Sódica al 0,1% durante 48 horas en agitación constante a 200 RPM y 37°C en un agitador orbital (Thermo Scientific). Las membranas decelularizadas son cortadas en rectángulos de 3x4 cm, esterilizadas en óxido de etileno y guardadas hasta su uso.

Lesión uretral (Primera cirugía): La inducción fue realizada con Ketamina 35 mg/kg (IM) y Xilazina al 20% 5 mg/kg (IM). Luego los conejos fueron colocados en la mesa de operación en posición supina. Posteriormente se realizó intubación orotraqueal y el mantenimiento de la anestesia se hizo con Isoflurano al 2%,

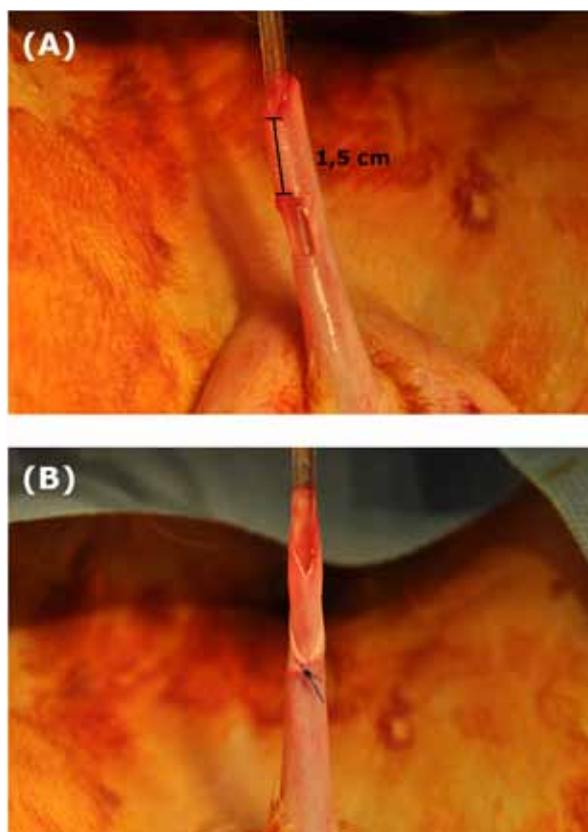


Figura 1. (A) Lesión a 1,5 cm del meato uretral. (B) La lesión se sutura con material no reabsorbible para identificación futura.

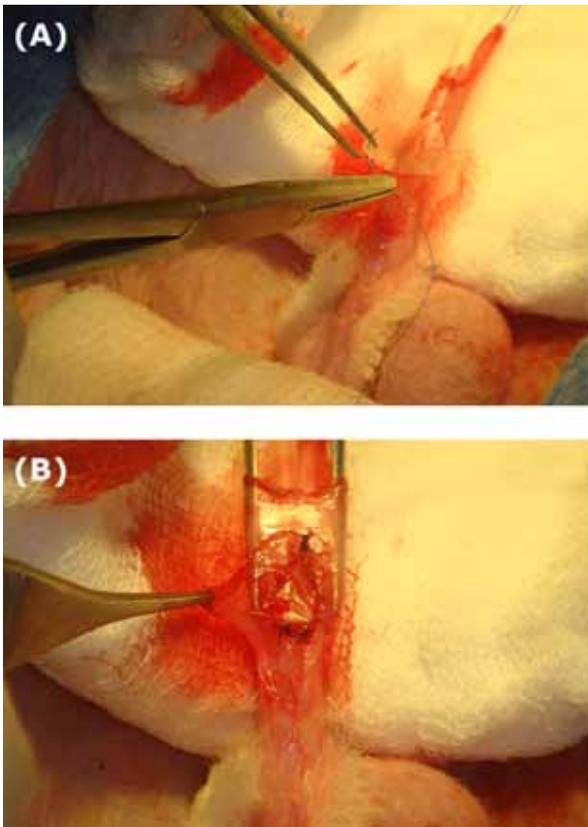


Figura 2. (A) Sutura de SIS sin células. (B) Uretroplastia Onlay.

bajo ventilación espontánea. Se rasuraron los animales, previo a la antisepsia, la que fue realizada con iodopovidona y luego campos estériles fueron colocados dejando el área genital y abdomen inferior libre. Se colocó catéter K31 en uretra lubricado con Xylocaína jalea y se realizó uretrotomía con tijera a 1,5 cm del meato uretral y suturado con una "X" de prolene "4-0" para futura identificación (Figura 1).

Uretroplastia "onlay": Los conejos fueron anestesia-

dos y preparados como fuera mencionado arriba para la primera cirugía. Con K31 en la uretra, el punto de prolene fue identificado y resecado un parche de 1 cm de diámetro. La SIS se orientó con el lado mucoso hacia la cara luminal de la uretra y fue suturada utilizando sutura continua de vicryl 5-0 a los bordes del defecto uretral. Luego una capa de tejido celular fue reaproximado sobre el defecto y la piel fue suturada con vicryl 4-0. Puntos de prolene 4.0 a proximal y distal fueron utilizados como sutura de referencia al momento del sacrificio (Figura 2).

Uretrografía y cistoscopia: A todos los animales se realizó uretrografía retrógrada y cistoscopia, previo al sacrificio. Luego de sedarlos con fenobarbital, se colocó un catéter K31 en el meato uretral y se inyectó contraste iodado mientras se realizaba radioscopia. Luego con la utilización de un cistoscopio pediátrico (Wolf, Alemania) se practicó cistoscopia para visualización de la uretra.

Esquema de sacrificio: Todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital a las 2, 4, 12, 24 y 36 semanas luego de la última cirugía. Los conejos fueron rasurados, el pene seccionado entre las suturas no reabsorbibles y colocados en formol al 4% para fijación del material.

Histología: Se realizó evaluación macroscópica y microscópica de la pieza. Las mismas se colocaron en parafina confeccionando un taco que fue posteriormente cortado con micrótopo y teñido con Hematoxilina y Eosina y Tricómico de Masson y evaluados bajo microscopia óptica. También se practicó inmunohistoquímica a los cortes, para marcar el epitelio se usó anticuerpos anti-pancitokeratinas AE1/AE3 (Chemicon Internacional, INC) y el músculo liso con anticuerpos anti-alfa actina (Novocastra Laboratories LTD, United Kingdom) y vistos bajo microscopio de fluorescencia (Figura 3).

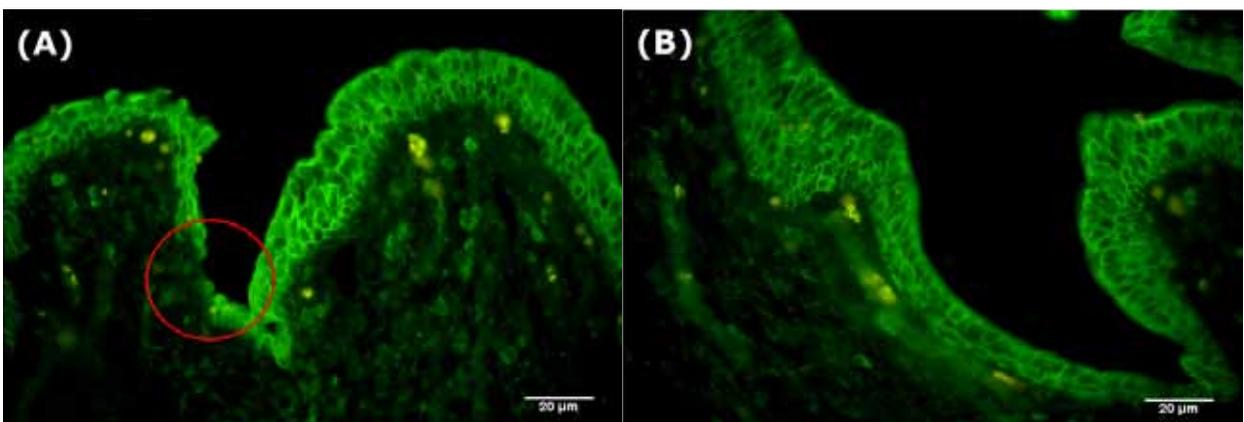


Figura 3. Tinción con anticuerpos Pan-citokeratina (verde). (A) Dos semanas post uretroplastia, epitelio estratificado con áreas de monocapas; (B) Nueve meses post uretroplastia, epitelio normal.

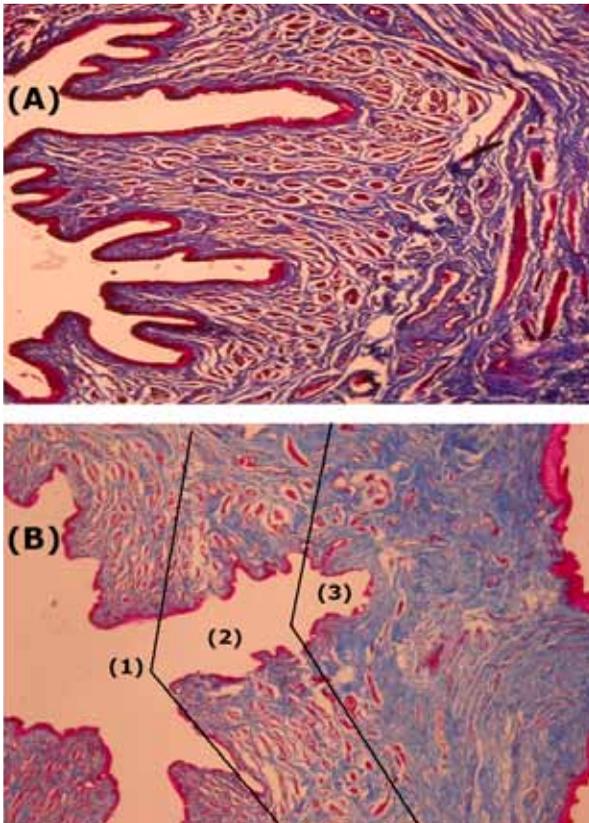


Figura 4. Tinción con Tricrómico de Masson. (A) Uretra normal; (B) Uretra, 9 meses post uretroplastia: (1) uretra normal; (2) zona periférica; (3) zona central.

Software y estadística: Se utilizó el programa ImageJ 1.44p para contar celular en las muestras y se utilizó el test de student a dos colas del paquete estadístico STATA8 para evaluar diferente distribución de músculo liso en las muestras.

RESULTADOS

Todos los animales sobrevivieron a ambas cirugías sin ninguna evidencia de infección o dificultad miccional. Dos animales en el grupo control y uno en el grupo uretroplastia presentaron estenosis. Tres fistulas se evidenciaron en el grupo uretroplastia. Ningún animal fue cateterizado en el postoperatorio de ambas cirugías, por lo tanto no se observó ningún inconveniente relacionado con los catéteres como fuera descripto por otros autores que sí usaron sondas uretrales. La uretrografía fue realizada antes del sacrificio agendado, las mismas evidenciaron estenosis de la uretra péndula en dos animales del grupo control (uno sacrificado a las cuatro semanas y el otro a las doce semanas) y en uno del grupo uretroplastia (sacrificado a las veinticuatro semanas). A su vez se pudo ver por este método tres

fistulas en la uretra péndula en el grupo uretroplastia (un animal a las cuatro, doce y veinticuatro semanas). La cistoscopia fue hecha posterior a la uretrografía, se pudo ver en aquellos casos en los que no se encontró estenosis y fistula en un epitelio normal incluso a los 15 días post uretroplastia, evidenciando el normal proceso de epitelización del parche de SIS con células uretrales.

GRUPO URETROTOMÍA: En todos los tiempos de sacrificio se observó un epitelio columnar con tres a cuatro capas de células de espesor en el lumen uretral. Fibras musculares se observaron alrededor de la zona de uretrotomía donde se pudo ver células inflamatorias con áreas de hemorragia y zonas de fibrosis.

GRUPO URETROPLASTIA: No se observó formación de divertículos o retracción completa del parche de SIS. Microscópicamente se evidenció a los 15 días un epitelio completo con tres a cuatro capas de espesor de células epiteliales con algunas áreas conteniendo una monocapa de células epiteliales. Se observó, en esta instancia, presencia de la matriz colágena completamente infiltrada por células inflamatorias, con ausencia de células musculares lisas. La uretra de los animales sacrificados al mes post uretroplastia mostró epitelio columnar normal de tres a cuatro capas de espesor, con ausencia de sectores conteniendo monocapas de células epiteliales. Se observaron restos de matriz colágena con menor densidad de células linfoides y ausencia de fibras musculares lisas. Solo se observaron algunas células musculares lisas formando pequeños vasos de neoformación. A las doce semanas el epitelio siguió sin cambios, ya no se observaron restos de SIS y comenzaron a observarse fibras musculares lisas desorganizadas, sin seguir un patrón determinado, con mayor densidad a la altura de los sitios de anastomosis. A las veinticuatro semanas se observó reemplazo completo de la matriz colágena y se vio gran concentración de células musculares lisas a nivel de los sitios de la anastomosis y menor densidad en el centro del parche ($p < 0,05$). A las treinta y seis semanas casi no se observaron diferencias con las uretras evaluadas a las veinticuatro semanas (**Figura 4**).

DISCUSIÓN

Los materiales biocompatibles están siendo utilizados ampliamente en medicina regenerativa. Dentro de los biomateriales más utilizados en urología se encuentra la submucosa de intestino delgado porcino (SIS) usado originariamente para ampliar vejigas en ratas y perros¹⁴. Tanto en animales como en humanos se comprobó que SIS promueve la migración celular¹⁵ y la organización tridimensional de dichas células dentro del andamio

biológico¹⁶. Las causas por las que SIS promueve procesos regenerativos están relacionados con factores de crecimiento, neovascularización, reepitelización y diferenciación tisular¹⁴. En algunos estudios se pudo documentar que SIS es rápidamente degradada por el huésped dentro de las tres semanas post implante¹⁷. Si bien SIS es una membrana no inmunogénica, se ha observado reacción inflamatoria alrededor del injerto¹⁸ que posibilitaría la degradación del material o quizás promueva los procesos de neovascularización¹⁶. Dado la aceptación cada vez mayor de SIS por parte de los investigadores se comenzó a utilizar para el reemplazo de órganos huecos como la uretra. Esto está particularmente relacionado con que la uretra es un órgano de simple funcionamiento, ya que solo conduce orina desde la vejiga hasta el exterior del cuerpo y a que es de simple acceso. Diferentes técnicas para reparar uretras en animales se han publicado utilizando SIS; la más ampliamente utilizada es la uretroplastia “onlay” (parche) y la uretroplastia tubular. Ambas técnicas pueden hacerse con o sin células sembradas. Varios trabajos han demostrado regeneración uretral en animales, como este trabajo publicado por Badylak y cols. en 1998¹⁹, donde comparó tres grupos diferentes de conejos a los que se les realizó tratamientos distintos. A un grupo se le realizó solo uretrotomía, al segundo uretroplastia con colgajo prepucial y al tercer grupo injerto “onlay” con SIS sin células sembradas. Luego de tres meses de seguimiento, observaron completa epitelización de la mucosa, con un epitelio estratificado de tres a cuatro capas de células. Las fibras musculares lisas fueron irregulares y discontinuas careciendo de distribución normal. Un año más tarde, Atala y cols.²⁰ usando como matriz colágena submucosa de vejiga porcina y el mismo modelo animal, pero con un seguimiento mayor, describió al igual que Badylak, completa regeneración de la capa epitelial. A los dos meses las fibras musculares lisas eran discontinuas e irregulares y a los seis meses la organización de las fibras musculares era normal. Por lo tanto, pudieron concluir que seis meses son suficientes para obtener una uretra casi indistinguible de una uretra normal. El mismo grupo del Dr. Atala, en el año 2002,²¹ publicó un trabajo en conejos donde comparó uretroplastias tubulares sembradas con células y uretroplastias tubulares sin células. A un grupo se le tomó una pequeña biopsia de vejiga y las células uroteliales fueron cultivadas *in vitro* y luego colocadas en una matriz colágena construyendo un tubo que se utilizó como injerto tubular y se lo comparó con igual procedimiento pero sin células. Lo que observaron, luego de seis meses de seguimiento, fue que los segmentos sin células presentaron epitelio irregular, músculo liso

desorganizado y todos tuvieron estenosis o colapsaron; en cambio, los injertos tubulares sembrados con células no se estenosaron, tuvieron un aspecto normal ante la visión macroscópica, el epitelio fue normal y presentaron fibras musculares lisas organizadas comparables con una uretra normal. El-Assmy y cols.²² en 2004 compararon distintas técnicas de reparación uretral en animales. Los grupos con uretroplastia “onlay” con SIS comercial sin células e injerto tubular acelular fueron seguidos durante tres meses y observaron en el grupo “onlay” epitelización completa con falta de regeneración del músculo liso y en los injertos tubulares hubo fistulas y estenosis en todos los casos.

Para resumir los conceptos actuales, se sabe que cuando se utiliza un parche de cualquier matriz colágena menor a un centímetro de diámetro, no se necesita colocar células sobre los andamios biológicos, en cambio para parches mayores de 1 centímetro de diámetro o injertos tubulares, se necesitan células para su éxito²¹.

Pero todos estos trabajos fueron realizados en animales sanos, con uretras normales, pero los pacientes candidatos a una uretroplastia no tienen uretras saludables, sino que presentan algún tipo de malformación congénita o traumatismo uretral o falla de alguna cirugía previa. Por este motivo pensamos en la manera de mejorar nuestro modelo animal para obtener datos más precisos y tener mejor información para trasladar a nuestros pacientes. Por eso pensamos en un modelo animal con lesión uretral previa, para evaluar si el poder regenerativo de SIS es mantenido en un ambiente de daño tisular y fibrosis. Por eso realizamos una disección uretral leve, seguido de uretrotomía y cierre a manera de daño uretral y al mes reparamos el daño ventral de la uretra a través de una uretroplastia onlay con SIS sin sembrar y evaluamos los cambios histológicos en el tiempo. Con respecto al epitelio, ya a los quince días post uretroplastia se observó epitelización completa de SIS en forma columnar, salvo algunas áreas cubiertas con una monocapa de células epiteliales. Al mes y de allí en adelante el epitelio se vio normal. Las células musculares lisas no aparecieron en ninguno de los animales sacrificados a los quince días, ni al mes post uretroplastia. A los tres meses se comenzó a visualizar fibras musculares lisas irregulares, discontinuas. A los seis meses se evidenció mayor densidad de fibras musculares predominantemente en los sitios de las anastomosis. A los nueve meses, la distribución no cambió, siendo casi idéntica a lo observado a los seis meses.

La uretra que obtuvimos no es histológicamente normal, la pregunta que arroja esta afirmación es: ¿debería usarse? Ya que cuando se utilizan otros tejidos

como dermis, mucosa bucal, etc., histológicamente estos tejidos no se parecen a una uretra normal y, sin embargo, tienen buenos resultados. Por ello deberían hacerse estudios para demostrar si esta uretra obtenida por medio de ingeniería de tejidos, pese a no ser morfológicamente igual a una uretra normal, puede ser usada como injerto con resultados comparables.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio sugiere que SIS promueve regeneración en uretras dañadas. El análisis histológico de las uretras mostró un patrón anormal, con retraso en la epitelización y anormal distribución de las fibras musculares lisas. Por lo tanto, nuestro modelo animal se asemeja más a la realidad de nuestros pacientes que los modelos animales sin lesión previa uretral, ya que el daño causado por trauma interfiere con el proceso normal de cicatrización. Este es el motivo por el cual creemos que nuestro modelo animal podría ser útil en el futuro para analizar el desarrollo de nuevos biomateriales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Turner-Warwick R. The repair of urethral strictures in the region of the membranous urethra. *J Urol.* 1968; 100:303-314.
2. Devine PC, Horton CE, Devine CJ Sr, Devine CJ Jr, Crawford HH, Anamson JE. Use of full thickness skin grafts in repair of urethral strictures. *J Urol.* 1963; 90:67-71.
3. Brannan W, Ochsner MG, Fuselier HA, Goodlet JS. Free full thickness skin graft urethroplasty for urethral stricture: experience with 66 patients. *J Urol.* 1976; 115:677-680.
4. Devine CJ Jr, Horton CE. A one stage hypospadias repair. *J Urol.* 1961; 85:166-172.
5. Hendren WH, Reda EF. Bladder mucosa graft for construction of male urethra. *J Pediatr Surg.* 1986; 21:189-192.
6. Li ZC, Zheng YH, Shey YX, Cao YF. One-stage urethroplasty for hypospadias using a tube constructed with bladder mucosa: a new procedure. *Urol Clin North Am.* 1981; 8:463-470.
7. Ozcan M, Kahveci R. One stage repair of distal and midpenile hypospadias by a modified Hodgson III technique. *Eur J Plast Surg.* 1987; 10:159-163.
8. Snow BW, Cartwright PC. Tunica vaginalis urethroplasty. *Urology* 1992; 40:442-5.
9. Duckett JW, Cople D, Ewalt D, Baskin LS. Buccal mucosal urethral replacement. *J Urol.* 1995; 153:1660-3.
10. Ezzell C. Pig intestine yields versatile tissue graft. *Science News* 1992; 141:246-247.
11. Kropp BP, Rippey MK, Badylak SF, y cols. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic evaluation in long term canine bladder augmentations. *J Urol.* 1996; 155:2098-2104.
12. Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, y cols: Experimental assessment of small intestine submucosa as a bladder wall substitute. *Urology* 1995; 46:396-400.
13. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, y cols: Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in that dog. *J Surg Res.* 1989; 47:74-80.
14. Pope JC, Davis MM, Smith ER Jr. y cols. The ontogeny of canine small intestinal submucosa regenerated bladder. *J Urol.* 1997; part 2, 158:1105.
15. Cobb MA, Badylak SF, Janas W, y cols: Histology after dural grafting with small intestinal submucosa. *Surg Neurol.* 1996; 46:389.
16. Badylak SF, Record R, Lindberg K, y cols. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; 9:863.
17. Kropp P, Rippey MK, Badylak SF, y cols. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol.* 1996; 155:2098.
18. Badylak SF, Arnoczky S, Plouhar P, y cols. Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin Orthop.* 1999; suppl., 367S:S333.
19. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, y cols. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology* 1998; 52:138.
20. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology.* 1999; 54(3):407-10.
21. De Filippo Roger E, Yoo James J and Atala Anthony. Urethral replacement using cell seeded tabularized collagen matrices. Vol. 168, 1789-1793, October 2002.
22. El-Assmy A, El-Hamid MA, Hafez AT Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int.* 2004; 94(7):1132-5.