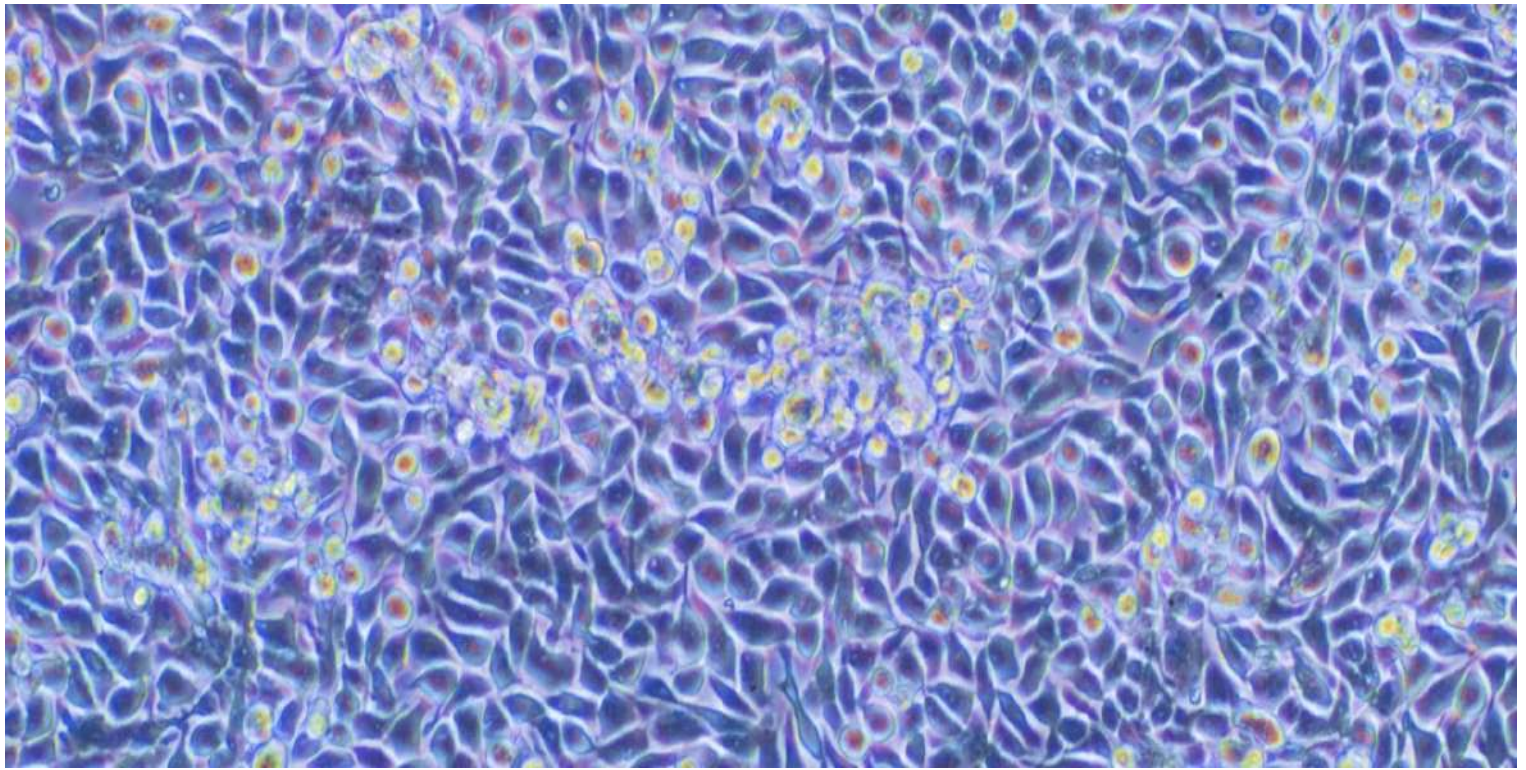


Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina



TESIS DOCTORAL

CREACIÓN DE TEJIDO URETRAL MEDIANTE
INGENIERÍA TISULAR PARA LA REPARACIÓN DE
DEFECTOS URETRALES COMPLEJOS EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOSPADIAS
PROXIMAL EN CONEJOS

María Virginia Amesty Morello

Directores: Pedro López Pereira y Magdalena Fossum

Tutora: María José Martínez Urrutia



PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y CIRUGÍA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ (IdiPAZ)

TESIS DOCTORAL

CREACIÓN DE TEJIDO URETRAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR
PARA LA REPARACIÓN DE DEFECTOS URETRALES COMPLEJOS
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOSPADIAS PROXIMAL EN
CONEJOS

Doctoranda: María Virginia Amesty Morello
Directores: Pedro López Pereira y Magdalena Fossum
Tutora: María José Martínez Urrutia

Julio de 2021

A mis padres María Auxiliadora y Luis Guillermo

A Pablo, y mis hijas Victoria y Clara

Mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a los directores de esta Tesis Doctoral. Al Dr. López Pereira por su apoyo incondicional para desempeñar la actividad científica en el campo de la Urología Pediátrica y de la Investigación básica. Gracias a su gran experiencia profesional y al soporte que me ha brindado en todo momento, he podido llevar a cabo este proyecto e iniciarme en el camino de la investigación en Urología Pediátrica. Su proyección internacional y su gran visión de cirujano son un gran ejemplo a seguir. A la Dra. Magdalena Fossum por ser mi mentora en el campo de la Ingeniería tisular y la investigación básica, por haberme acogido en su laboratorio como un miembro más de su equipo, y por transmitirme sus conocimientos y su entusiasmo por la investigación básica. Ella es otro gran modelo a seguir.

De igual forma quisiera agradecer a la tutora de esta tesis doctoral, a la Dra. Martínez Urrutia, por despertar en mi la ilusión por la Urología Pediátrica y formarme cada día como cirujana. Su disciplina, constancia, destreza quirúrgica y gran calidad humana constituyen para mi el prototipo ideal de profesional. Asimismo quiero dar las gracias a la Dra. Rivas y al Dr. Lobato, por toda la enseñanza que me han brindado en el campo de la Urología Pediátrica y por su soporte incondicional para poder desempeñar este proyecto de investigación.

A mis mentores en mis primeros pasos como cirujana pediátrica. Al Dr. Tovar, Dr. Martínez, Dr. Murcia, Dr. Hernández y Dr. López Gutiérrez, por haberme abierto el camino para desarrollarme como cirujana y como investigadora, y por continuar apoyándome en el presente en todos mis proyectos.

A los compañeros del Instituto IdiPAZ. A los miembros del equipo de Cirugía Experimental, en especial a la Dra. Largo, por su apoyo para desempeñar este estudio en conejos. Al equipo del laboratorio cultivos celulares e inmunohistoquímica, por su tutela en para llevar a cabo los cultivos y el estudio histológico e inmunohistoquímico. Y muy en especial a Beatriz Sanz, por ser mi mano derecha que el desarrollo de los cultivos celulares, sin su colaboración este proyecto no había sido posible.

A mi familia, mis padres Luis y María y mis hermanos Alejandra y Luis Guillermo, por su impulso constante para alcanzar todas mis metas y por su confianza en mi.

A mis hijas, por darme la ilusión cada día y regalarme la felicidad plena para desarrollarme en todos los aspectos de mi vida.

Y finalmente y mi agradecimiento más especial para Pablo, por su amor incondicional, por ayudarme a alcanzar todos mis sueños y por hacerme cada día mejor persona.

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	12
GLOSARIO	13
RESUMEN	14
RESUMEN EN INGLÉS – SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	16
A. HIPOSPADIAS	18
Definición	18
Epidemiología y etiología	18
Clasificación	19
Objetivos de la corrección quirúrgica del hipospadias.....	20
Técnicas quirúrgicas.....	20
Complicaciones del tratamiento del hipospadias.	27
Resultados del tratamiento quirúrgico convencional	30
B. HISTOLOGÍA DE LA URETRA.....	33
Histología de la uretra humana.....	33
Histología de la uretra del conejo blanco gigante de nueva zelanda.....	35
C. INGENIERÍA TISULAR APLICADA A LA REPARACIÓN DEL HIPOSPADIAS Y URETRAL.....	38
Introducción	38
Matrices acelulares	38
Matrices sembradas con células	40
Perspectivas futuras de la ingeniería tisular aplicada a la reparación uretral	42
D. HIPÓTESIS	43
E. OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Consideraciones éticas.....	47
Creación del modelo experimental de defecto uretral en conejos.....	47
Creación de tejido uretral mediante ingeniería tisular	51
Reparación del defecto uretral y evaluación <i>in vivo</i> del tejido uretral creado	53
RESULTADOS	57
Modelo experimental de defecto uretral	57
Tejido uretral creado mediante ingeniería tisular	60
Resultado de la uretroplastia y evaluación <i>in vivo</i> del tejido uretral creado.....	66
DISCUSIÓN	77
Creación del modelo de hipospadias proximal en conejos.....	77
Desarrollo de tejido uretral mediante ingeniería tisular.....	78
Uretroplastia con tejido uretral de ingeniería tisular	79
Limitaciones	81
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Ejemplo de un hipospadias en un paciente pediátrico. (A) Vista perineal del pene donde se aprecia el meato uretral en posición interesrotal (flecha roja). (B) Vista anterior del pene donde se aprecia la malformación prepucial. (C) Vista lateral del pene donde se aprecia la curvatura del pene y el defecto prepucial ventral del pene. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).18
- Figura 2:** Ejemplos de las categorías de hipospadias según la clasificación de Duckett (Las fechas rojas muestran la posición del meato uretral). (A) Hipospadias anterior con meato a nivel subcoronal. (B) Hipospadias medio con meato a nivel peneano proximal. (C) Hipospadias posterior con meato en posición interesrotal. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).....19
- Figura 3:** Curvatura peneana en un caso de hipospadias tras el denudamiento del pene y disección de la uretral. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).21
- Figura 4:** Avance uretral MAGPI. (Fuente: Partin AW, Peters CA, Kavoussi LR, Dmochowski RR, Wein AJ. Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020).....22
- Figura 5:** Uretroplastia tipo TIP o procedimiento de Snodgrass. (Fuente: Snodgrass WT. Snodgrass technique for hypospadias repair. BJU Int. 2005 Mar;95(4):683-93).....23
- Figura 6:** Técnica de uretroplastia de colgajo con base meatal. Procedimiento de Mathieu. (Fuente: Hadidi AT. The slit-like adjusted Mathieu technique for distal hypospadias. J Pediatr Surg. 2012 Mar;47(3):617-23).....24
- Figura 7:** Técnicas de uretroplastia basadas en colgajos prepuciales: (A) Procedimiento de Onlay. (B) Procedimiento de Duckett. (C) Procedimiento de Koyanagi. (Fuente: McDougal WC, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell's Urology. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2012)25
- Figura 8:** Primer tiempo de uretroplastia según técnica de Bracka. (Fuente: Partin AW, Peters CA, Kavoussi LR, Dmochowski RR, Wein AJ. Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020)26
- Figura 9:** Uretra masculina donde se detallan sus 3 segmentos: uretra protática, uretra membranosa y uretra esponjosa. (Fuente: Netter FH. Atlas de Anatomía Humana.. 3ª Edición. Barcelona, España, Masson, S.A.; 2003).33
- Figura 10:** Imagen histológica de la uretra peneana o esponjosa: (A) Imagen a baja magnificación que muestra el epitelio de transición columnar estratificado y pseudoestratificado con sus pliegues, así como la lámina propia rica en vascularización. (B) Imagen a mayor magnificación que muestra el detalle del epitelio columnar estratificado, así como la lámina propia con plexos vasculares (flechas). (Fuente: Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology: with Correlated Histopathology, Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2021).34
- Figura 11:** Imagen anatómica de la uretra de conejo donde se aprecia los segmentos uretrales: (Pelvic urethra) uretra pélvica con su secciones de uretra pre-prostática (ppu) y prostática (pu). (Penile urethra) uretra peneana. (b) Vejiga. (vg) Glándula vesical seminal. (Fuente: Skonieczna J, Madej JP, Kaczmarek-Pawelska A, Będziński R. Histological and morphometric evaluation of the urethra and penis in male New Zealand White rabbits. Anat Histol Embryol. 2021 Jan;50(1):136-143).35
- Figura 12:** Sección transversal de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el cuerpo cavernoso dorsal y la luz uretral ventral (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).36
- Figura 13:** Imagen a mayor magnificación de la sección transversal de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el cuerpo cavernoso dorsal, la luz uretral ventral y el cuerpo esponjoso rodeando la uretra. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).36

Figura 14: Imagen histológica de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el epitelio de transición columnar estratificado, así como la lámina propia con abundante vascularización. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).....	37
Figura 15: Pene del conejo gigante de Nueva Zelanda (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). (A) Cara dorsal del pene. (B) Cara ventral del pene.....	48
Figura 16: Procedimiento anestésico para llevar a cabo el modelo de hipospadias.....	48
Figura 17: Creación del modelo de hipospadias. (A) Pene con el dibujo del área de resección uretral para crear el defecto hipospádico. (B) Resultado final de la creación del defecto.	49
Figura 18: Ejemplos de medida del defecto uretral mediante la aplicación SketchAndCalcTM, que cuantifica la superficie exacta del defecto mediante el uso de una fotografía del pene utilizando una escala de referencia, basada en la dimensión de la sonda uretral que es una medida fija. (A) Medida del conejo 21 a las 5 semanas de la creación del defecto, 67,62mm ² . (B) Medida del conejo 22 a las 5 semanas de la creación del defecto, 70,19mm ²	50
Figura 19: Técnica de lavado vesical.	51
Figura 20: Técnica de uretroplastia: colocación de material elegido para la uretroplastia a modo “Onlay” para cubrir el defecto uretral. (A) Uretroplastia con tejido uretral de ingeniería tisular. (B) Uretroplastia con matriz SIS.	54
Figura 21: Modelo de defecto uretral del conejo 1. (A) Pene de conejo con el dibujo del área de resección uretral para crear el defecto. (B) Defecto uretral recién creado. (C) Defecto uretral crónico grande después de 3 meses de su creación. (D) Área calculada del defecto uretral final (mediante la aplicación SketchAndCalcTM).	58
Figura 22: Cistouretrografía miccional a los 3 meses de creación del modelo de defecto uretral del conejo 1 donde se aprecia gran fuga urinaria en la zona del defecto (flecha roja).	59
Figura 23: Imagen histológica en H&E del pene del conejo 1 con el modelo de hipospadias. (A) Imagen de un corte axial completo del pene, donde se aprecia el cuerpo cavernoso en la zona dorsal del pene (arriba) y la uretra en la zona ventral (abajo) que presenta una solución de continuidad en su cara más ventral en la zona del defecto uretral creado. (B) Imagen magnificada (objetivo 40X) donde se identifica el epitelio estratificado queratinizado en los bordes del defecto (flecha roja) y un epitelio tipo urotelial en la cara lateral y dorsal de la uretra (flecha azul).	60
Figura 24: Imagen microscópica del cultivo de células uroteliales sobre la placa de cultivo recubierta de Biolamina en estado de subconfluencia celular (70-80% de ocupación del pocillo).	63
Figura 25: Tejido uretral creado mediante ingeniería tisular. (A) Tinción de H&E del tejido uretral que muestra un urotelio estratificado de 3 a 5 capas celulares sembrado en la matriz SIS en aumento 40x. (B) Igual que (A) con un aumento de 100x. (C) Tinción inmunohistoquímica con marcador de células uroteliales CK7 donde se aprecia en marrón la tinción positiva del marcador contrastado con hematoxilina. (D) Ejemplo de un corte histológico con H&E de la uretra peneana nativa de conejo, donde se puede apreciar la similitud del cultivo creado con el nativo.	65
Figura 26: Ejemplo del resultado macroscópico de la uretroplastia de un conejo del grupo B y del grupo C (A) Área uretral reparada del conejo 17 del grupo B. (B) Área uretral reparada del conejo 20 del grupo C.	67
Figura 27: Cistouretrografía miccional de conejos del grupo B y C. (A) Cistouretrografía del conejo 11 del grupo B donde se aprecia la fístula urinaria a nivel del defecto uretral (flecha azul). (B)) Cistouretrografía del conejo 16 del grupo C donde se constata la ausencia de fístulas.	69
Figura 28: Imágenes histológicas del conejo 3 del grupo B en donde se aprecia una sección axial del pene a nivel del defecto uretral final tras la uretroplastia. (A) Corte axial donde se aprecia la uretra nativa (flecha azul) que se continúa con metaplasia escamosa a nivel de los bordes del defecto uretral (B) Detalle donde se aprecia el cambio de la uretra nativa (flecha azul) a la metaplasia escamosa adyacente a la piel peneana externa (flecha roja).	70

- Figura 29:** Imágenes histológicas del conejo 4 del grupo C en donde se aprecia una sección axial del pene a nivel de la corrección del defecto uretral. (A) Corte axial a bajo aumento donde se aprecia el cilindro uretral completamente corregido, con la zona de la neouretra en la parte superior (flecha azul) y la uretra nativa en la parte inferior de la imagen (flecha roja). (B) Detalle del mismo corte axial donde se aprecia la neouretra, el tejido conectivo con vascularización subyacente a la uretra y la piel. No se aprecian zonas de metaplasia o atipia celular en la uretra corregida..... 71
- Figura 30:** Imagen inmunohistoquímica de una zona de uretra reparada del conejo 4 del grupo C. Se aprecia en la parte superior (flecha azul) el epitelio urotelial estratificado con tinción positiva (marrón) para CK7. Además se aprecia en las capas inferiores el tejido subcutáneo subyacente y la piel..... 72
- Figura 31.1:** Conejos del grupo B (Uretroplastia con matriz SIS): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción uretral con la matriz de submucosa del intestino delgado porcino SIS Cook-Biotech®. (B) Aspecto postoperatorio inmediato de la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrografía miccional que muestra fístula uretral. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral que demuestra la ausencia de la uretra ventral y la continuidad entre la uretra dorsal (abierta) y la piel del pene con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la uretra..... 73
- Figura 31.2:** Conejos del grupo B (Uretroplastia con matriz SIS): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción uretral con la matriz de submucosa del intestino delgado porcino SIS Cook-Biotech®. (B) Aspecto postoperatorio inmediato de la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrografía miccional que muestra fístula uretral. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral que demuestra la ausencia de la uretra ventral y la continuidad entre la uretra dorsal (abierta) y la piel del pene con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la uretra..... 74
- Figura 32.1:** Conejos del grupo C (Uretroplastia con tejido uretral creado con ingeniería tisular): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción. (B) Aspecto postoperatorio inmediato tras la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrograma miccional que muestra fístula uretral o reparación uretral completa sin fístula. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral reparada que muestra el tejido urotelial multicapa o muestra una fístula uretral con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la fístula (H&E). 75
- Figura 32.2:** Conejos del grupo C (Uretroplastia con tejido uretral creado con ingeniería tisular): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción. (B) Aspecto postoperatorio inmediato tras la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrograma miccional que muestra fístula uretral o reparación uretral completa sin fístula. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral reparada que muestra el tejido urotelial multicapa o muestra una fístula uretral con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la fístula (H&E). 76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Escala de bienestar animal aplicada para la supervisión de los animales. El rango de puntuación es 0-12 puntos, donde 0 puntos corresponde a un estado normal y 12 puntos es la puntuación máxima permitida, siendo criterio de punto final que obliga al sacrificio anticipado del animal de acuerdo con los principios de éticos de experimentación animal. El valor considerado para cada conejo fue la puntuación máxima obtenida durante la aplicación del protocolo de supervisión (14 días).....	49
Tabla 2: Grupos estudio para evaluación in vivo de los tejidos uretrales creados por ingeniería tisular....	53
Tabla 3: Puntuación obtenida para cada conejo en la escala de bienestar durante las dos semanas postoperatorias en la que se aplicó del protocolo de supervisión. El valor de puntuación corresponde al valor máximo obtenido para cada conejo durante todo el período de supervisión.	57
Tabla 4: Área del defecto uretral para cada conejo en el momento de su creación, a las 5-6 semanas y a los 3 meses.....	58
Tabla 5: Evaluación de la técnica de lavado vesical: número de lavados por conejo, hematuria presente en el líquido de lavado determinada por tira reactiva de orina, número de células obtenidas por lavado, número de días hasta la aparición de las primeras colonias celulares en el cultivo. (Para los casos con 2 lavados por conejo se tomo en cuenta 2º lavado que dio a lugar colonias para el resto de valores).....	61
Tabla 6: Evaluación del procesamiento, cultivo y expansión de células uroteliales: número de días de cultivo en la placa con Biolamina, número de células obtenidas en el cultivo al alcanzar subconfluencia celular en la placa (previo al primer pase celular).....	63
Tabla 7: Evaluación de la siembra de las células uroteliales en la matriz y creación del epitelio estratificado: número de días de cultivo sobre la matriz de SIS en interfase aire-líquido para obtener estratificación celular.	64
Tabla 8: Puntuación obtenida para cada conejo en la escala de bienestar durante las dos semanas postoperatorias en la que se aplicó del protocolo de supervisión. El valor de puntuación corresponde al valor máximo obtenido para cada conejo durante todo el período de supervisión.....	66
Tabla 9: Área calculada del defecto uretral inicial y final de todos los grupos determinada la aplicación SketchAndCalcTM.	68
Tabla 10: Área calculada del defecto uretral inicial y final de todos los grupos determinada la aplicación SketchAndCalcTM.	68

GLOSARIO

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADM	Matriz de dermis a celular (del inglés: Acellular Dermal Matrix)
AR	Receptor de andrógenos (del inglés: Androgen Receptor)
BAM	Matriz de vejiga acelular (del inglés: Bladder Acellular Matrix)
CK7	Citoqueratina 7
CPE	Células progenitoras endoteliales (del inglés: Endothelial Progenitor Cells)
DAB	Cromógeno 3,3'-diaminobencidina
DMEM	Medio Dubelcco Eagle modificado (del inglés: Dubelcco Modified Eagle Medium)
EEUU	Estados Unidos de América
FBS	Suero fetal bovino (del inglés: Fetal Bovine Serum)
Fr	Escala francesa o escala de Charrière
GMP	Buenas prácticas de fabricación (del inglés: Good Manufacturing Practices)
H&E	Hematoxilina y eosina
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés: Horseradish Peroxidase)
HSD3B2	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ -5-4 isomerasa tipo II
MAGPI	Avance meatal y glanuloplastia incorporada (del inglés: meatal advancement and glanuloplasty incorporated)
<i>p</i>	Valor <i>p</i> estadístico
PGA	Ácido poliglicólico (del inglés: Poli-Glicolic Acid)
PLA	Ácido poliláctico (del Inglés: Poli-Lactic Acid)
PLGA	Ácido poli-láctico-co-glicólico (del Inglés: Poli-Lactic Co-Glicolic Acid)
RD	Real Decreto
SIS	Submucosa de intestino delgado (del inglés: Small Intestine Submucosa)
SRD5A2	3-oxo-5 α -esteroide 4-deshidrogenasa 2
TIP	Placa uretral incisa tubulizada (del inglés: Tubularized Incised Plate)
WT1	Proteína del Tumor de Wilms 1 (del inglés: Wilms Tumor 1)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular es una potencial fuente de sustitutos uretrales para tratar defectos uretrales graves. El objetivo de este estudio fue crear uretras de ingeniería tisular mediante la siembra de células uroteliales obtenidas de lavados de vejiga en una matriz, y utilizar estas “neouretras” para reparar defecto uretral tipo hipospadias proximal en un modelo de conejo.

MÉTODOS

Para crear el modelo se realizó un gran defecto uretral en conejos machos de Nueva Zelanda mediante la resección de un defecto elíptico (70 mm^2) en la uretra ventral del pene, dejándolo asentarse como un defecto crónico durante 5-6 semanas. Las células uroteliales se obtuvieron de forma no invasiva lavando la vejiga con solución salina y aislando células uroteliales. Las neouretras se crearon sembrando las células uroteliales en una matriz de submucosa de intestino descelularizada o matriz SIS (Small Intestine Submucosa) disponible comercialmente (Biodesign® Cook Biotech®). Para evaluar las neouretras creadas, 22 conejos fueron divididos en 3 grupos: El grupo-A ($n=2$) correspondió al grupo control (no reparación uretral). Los grupo-B ($n=10$) y grupo-C ($n=10$) fueron las ramas de tratamiento a los que se les realizó una uretroplastia, con matriz SIS aislada (grupo-B) y con la neouretra de ingeniería tisular (grupo-C). Se evaluó el aspecto macroscópico, radiológico e histológico de los penes tras la uretroplastia.

RESULTADOS

La creación del modelo de hipospadias proximal con un gran defecto uretral de tamaño estable en el tiempo fue exitosa. Se crearon neouretras de ingeniería tisular consistentes en un urotelio estratificado sembrado sobre la matriz SIS. Todos los conejos del grupo-A mantuvieron el tamaño del defecto uretral sin cambios ($70 \pm 2,5 \text{ mm}^2$). Todos los conejos del grupo-B presentaron dehiscencia de uretroplastia, con un área del defecto uretral mediana de $61(34-70) \text{ mm}^2$. En el grupo-C, 5 presentaron corrección completa y 5 corrección casi total con fístula, con un área de defecto mediana de $0,3(0-12,5) \text{ mm}^2$, demostrando un resultado superior muy significativo ($p=7,85 \times 10^{-5}$). La uretrografía mostró más fístulas en el grupo-B (10/10), frente al grupo-C (5/10) ($p=0,04$). No se encontró estenosis uretral en ninguno de los grupos. La histología del grupo-B identificó ausencia de uretra ventral en áreas no reparadas, con metaplasia escamosa en los bordes adyacentes al defecto. En las áreas reparadas del grupo-C, se identificó tejido urotelial estratificado con tinción positiva para el marcador de células uroteliales citoqueratina-7.

CONCLUSIONES

Se creó un modelo de conejo con un defecto uretral similar al hipospadias proximal estable en el tiempo. El lavado vesical fue un método viable para obtener células uroteliales para crear neouretras de ingeniería tisular mediante la siembra en una matriz SIS. La uretroplastia con neouretras creadas es factible y presenta resultados superiores en comparación con el uso de la matriz SIS aislada en el modelo de conejo. Las uretras de ingeniería tisular podrían considerarse como una opción de sustituto uretral para el tratamiento de defectos uretrales complejos y casos de hipospadias.

RESUMEN EN INGLÉS – SUMMARY

CREATION OF TISSUE-ENGINEERED URETHRAS FOR COMPLEX URETHRAL DEFECTS REPAIR IN A PROXIMAL HYPOSPADIAS EXPERIMENTAL MODEL IN RABBITS

INTRODUCTION

Tissue engineering is a potential source of urethral substitutes to treat severe urethral defects. The aim of this study was to create tissue-engineered urethras by seeding urothelial cells obtained from bladder washes in a matrix, and to use these “neourethras” to repair a proximal hypospadias rabbit model.

METHODS

A large urethral defect was first created in male New-Zealand rabbits by resecting an elliptic defect (70mm²) in the ventral penile urethra and then letting it settle down as a chronic defect for 5-6 weeks. Urothelial cells were harvested non-invasively by washing the bladder with saline and isolating urothelial cells. Neourethras were created by seeding urothelial cells on a commercially available decellularized small intestinal submucosa (SIS) matrix (Biodesign® Cook Biotech®). To evaluate the created neourethras, 22 rabbits were divided into 3 groups: Group-A (n=2) corresponded to control group (no urethral repair). Group-B (n=10) and group-C (n=10) were the treatment branches that underwent urethroplasty, with isolated SIS matrix (group-B) and with the tissue-engineered neourethra (group-C). Macroscopic, radiological and histological results were assessed.

RESULTS

A large urethral defect to simulate a proximal hypospadias model was successfully created and maintained a stable size. Tissue-engineered neourethras consisting in a stratified urothelium attached to the SIS matrix were obtained. All group-A rabbits kept the urethral defect size unchanged (70±2.5mm²). All group-B rabbits presented urethroplasty dehiscence, with a median defect of 61 mm² (range 34-70). In group-C, 5 presented complete correction, and 5 almost total correction with fistula, with a median defect of 0.3 mm² (range 0-12.5), demonstrating a significant better result ($p=7.85 \times 10^{-5}$). Urethrography showed more fistulas in group-B (10/10, versus 5/10 in group-C) ($p=0.04$). No strictures were found in any of the groups. Group-B histology identified absence of ventral urethra in unrepaired areas, with squamous cell metaplasia in the edges towards the defect. In group-C repaired areas, ventral multilayer urothelium was identified with cells staining for urothelial cell marker cytokeratin-7.

CONCLUSIONS

A rabbit model with a proximal hypospadias-like urethral defect stable in time was created. Bladder washing was a feasible method for harvesting viable urothelial cells to create tissue-engineered urethras by seeding these on a SIS matrix. Urethroplasty with tissue-engineered urethras feasible and presents superior results compared to using an isolated SIS matrix in the rabbit model. There is a place for considering tissue-engineered urethras in the surgical armamentarium for treating complex urethral defects and hypospadias cases.

INTRODUCCIÓN

El hipospadias es una malformación congénita común causada por un defecto en el desarrollo normal del pene, en el que existe un defecto de la uretra ventral, con el meato uretral ubicado por debajo de su posición normal, generalmente asociado a una curvatura anormal del pene y a una deficiencia del prepucio ventral [1]. Ocurre aproximadamente en 1 de cada 150 a 300 nacidos vivos [1-3].

El tratamiento de las hipospadias es quirúrgico. La reparación de los casos leves o hipospadias distales suele tener éxito con numerosas técnicas, pero el tratamiento de los casos graves o hipospadias proximales puede ser un desafío debido a la falta de tejido sano para la reconstrucción uretral. Hasta el momento se han descrito múltiples sustitutos de tejido uretral para la creación de una neouretra, como la mucosa prepucial, mucosa oral, mucosa vesical, injertos de piel retroauricular, entre otros [4-9]. Estos sustitutos tienen efectos secundarios bien documentados como la morbilidad del sitio donante, presentan diferencias mecánicas y biológicas en comparación con la uretra nativa, y en ocasiones ni siquiera están disponibles debido a múltiples intervenciones quirúrgicas previas.

La reconstrucción uretral mediante ingeniería tisular se ha planteado como una solución para los problemas relacionados con los sustitutos uretrales tradicionales para reparación uretral, mediante la creación de una “neouretra” (uretra nueva) en el laboratorio, que imite las funciones de la uretra nativa y que esté disponible en todo momento y en la cantidad necesaria para la reparación. Para simular las funciones de la uretra nativa, la neouretra de ingeniería tisular debe componerse de varias capas celulares, debe constituir una barrera eficaz contra la orina para proteger los tejidos subyacentes, debe ser vascularizada, y debe ser resistente a las fuerzas mecánicas que para permitir la manipulación quirúrgica [10].

La ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción uretral se ha planteado mediante 3 estrategias distintas: la reconstrucción con **células autólogas cultivadas**, la reconstrucción utilizando **biomateriales o matrices acelulares**, y una combinación de ambas técnicas utilizando matrices sembradas con células cultivadas, a lo que se denomina **constructos celulares** [10-12]. Las **células autólogas** cultivadas únicamente son muy vulnerables para ser transportadas y manipuladas quirúrgicamente, y por ello el uso de cultivos de células aisladas ha quedado en desuso. Por tanto las dos estrategias principales usadas en la actualidad para la reconstrucción uretral son las matrices acelulares y las matrices sembradas con células cultivadas o constructos celulares [11, 12].

Las **matrices acelulares** son estructuras de origen natural, sintéticos o híbrido, que proporcionan un soporte para las células nativas, las cuales migran de los tejidos adyacentes donde se implantan para desarrollar tejido sobre dichas matrices. Éstas se han utilizado tanto en estudios experimentales en animales como clínicos con resultados favorables para la corrección de pequeños defectos rodeados de un buen lecho celular y vascular [13-17].

Los constructos celulares son creados a partir de las matrices acelulares que se siembran con células autólogas y se cultivan en el laboratorio para posteriormente ser implantados. En estudios experimentales, los constructos celulares han demostrado resultados superiores a las matrices acelulares para la corrección de defectos uretrales grandes, presentando además una mayor vascularización y una disminución de la inflamación y la fibrosis en los lechos de reparación [11, 12, 18-20].

Diferentes tipos de células se han utilizado para la reconstrucción uretral mediante constructos celulares. Las más comunes son: células uroteliales, células de la mucosa bucal, queratinocitos, fibroblastos, células del músculo liso, células madre y células progenitoras [11, 12, 18]. Dichas células pueden obtenerse mediante biopsia del tejido o, como en el caso del urotelio, mediante métodos no invasivos como por ejemplo los lavados de vejiga [21-25].

A pesar de los buenos resultados preliminares en los estudios experimentales y clínicos, la aplicación de neouretras de ingeniería tisular en la práctica clínica es todavía escasa. La traslación a la clínica está limitada por carencia de una neouretra ideal en cuanto a sus propiedades físicas y biológicas, y que además sea sencilla de desarrollar [11, 12, 26]. Los métodos involucrados en el desarrollo de uretras de ingeniería tisular son generalmente complejos, y por tanto, la simplificación de sus procesos de creación podría permitir su amplia aplicación en pacientes.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es desarrollar una neouretra de ingeniería tisular de tipo constructo celular aplicando métodos sencillos, mediante la siembra de una matriz de submucosa del intestino delgado con células uroteliales obtenidas de lavados vesicales, y probarlo en un modelo de hipospadias proximal en conejos.

A continuación haremos una breve descripción de la patología del hipospadias para entender el problema en cuestión al que se busca dar solución. Luego se hará una breve descripción del la histología de la uretra nativa humana y del conejo, que será el tejido que se desea desarrollar en la presente tesis doctoral. Posteriormente se hará una descripción del estado del arte de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción uretral y en especial de la patología del hipospadias. Finalmente desarrollaremos las hipótesis y los objetivos del presente estudio.

A. HIPOSPADIAS

DEFINICIÓN

El hipospadias es una malformación congénita genital debida a una detención del desarrollo del pene que da lugar a una asociación de tres anomalías anatómicas: (1) una apertura anormal ventral del meato uretral; (2) una curvatura ventral (chorda) del pene; y (3) un prepucio anómalo en forma de capuchón, que está ausente o deficiente en la parte ventral [1, 4]. Sin embargo, no siempre estas tres características están presentes en todos los casos. Esta anomalía se debe a una hipoplasia de los tejidos que forman la cara ventral del pene [27] (Figura 1).

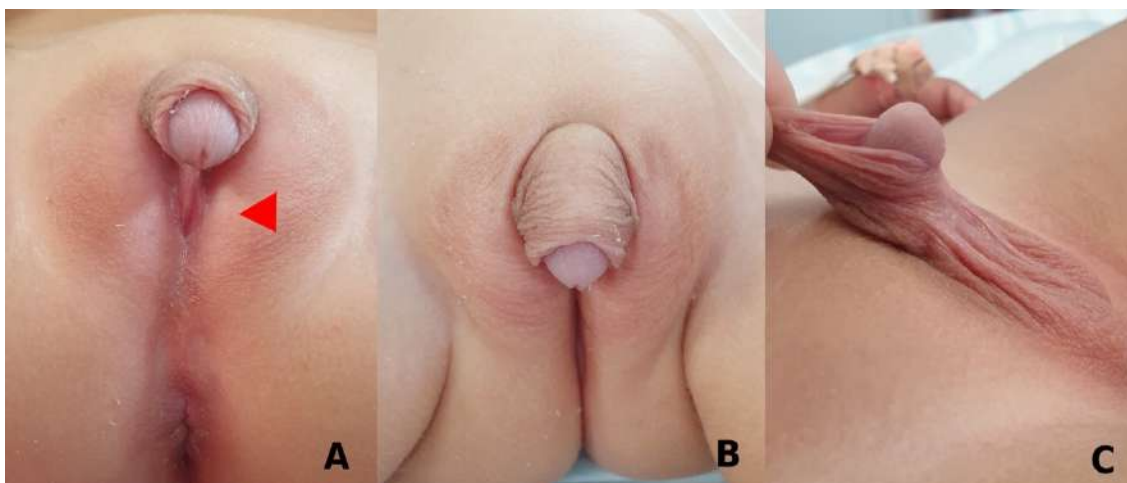


Figura 1: Ejemplo de un hipospadias en un paciente pediátrico. (A) Vista perineal del pene donde se aprecia el meato uretral en posición interescrotal (flecha roja). (B) Vista anterior del pene donde se aprecia la malformación prepucial. (C) Vista lateral del pene donde se aprecia la curvatura del pene y el defecto prepucial ventral del pene. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).

EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

La incidencia del hipospadias se calcula que es alrededor de 1 de cada 150-300 nacimientos de varones vivos [2, 3]. Numerosos estudios a nivel mundial han demostrado una prevalencia media del hipospadias muy variable que va desde 19,9 en 10.000 en Europa, 34,2 en 10.000 en el EEUU, 5,2 de cada 10.000 en América del Sur, 0,6–69,0 de cada 10.000 en Asia, 5,9 de cada 10.000 en África y de 17,1 a 34,8 en 10.000 en Australia [3,28]. Estas variaciones en la prevalencia pueden deberse a diversas causas como diferencias geográficas, factores genéticos, agentes ambientales, mayor conciencia de la patología hipospadias según la cultura y la disparidad en el reporte de hipospadias entre registros [29, 12].

Existe además una creciente percepción de que el hipospadias es cada vez más común en comparación con décadas previas. Si bien esto puede ser explicado en parte por un mayor registro de formas menores, hay evidencia de que existe un aumento real de la incidencia subyacente. Este aparente aumento de la incidencia del hipospadias, junto con el aumento de la incidencia de cáncer testicular y la disminución de la calidad del semen, se ha adjudicado a los

posibles efectos de contaminantes ambientales estrogénicos o disruptores endocrinos en la virilización normal del feto masculino [30, 31]. Además, situaciones como endocrinopatías, bajo peso al nacer y mayor edad materna, posiblemente mediada por insuficiencia placentaria, han sido identificadas por algunos estudios como posibles factores etiológicos [32, 33]. El hipospadias es más común en los gemelos monocigóticos y en los hijos de padres que tienen hipospadias, indicando que puede haber una herencia poligénica involucrada [34].

Mutaciones, variaciones en el número de copias y los polimorfismos de un solo nucleótido de diversos genes implicados en el desarrollo temprano del tubérculo uretral y genital, como los genes AR, SRD5A2, HSD3B2 y WT1, se asocian a la patología del hipospadias [32, 35-37]. A medida que mejore la tecnología para la secuenciación del genoma completo, probablemente se identificarán más variantes genéticas asociadas con el fenotipo de hipospadias. Las implicaciones clínicas de esta información emergente deberán analizarse minuciosamente y podrían ayudar a las familias a identificar predisposiciones a otras enfermedades.

CLASIFICACIÓN

Diferentes sistemas de clasificación del hipospadias han sido descritos hasta el momento y la mayoría de ellos se basa en la posición del meato uretral respecto a los genitales. Las dos clasificaciones más utilizadas son las propuestas por Duckett y Hadidi. Duckett categorizó el hipospadias en anterior (de glanular a peneano distal), medio (de mesopeneano a peneano proximal) y posterior (de penoescrotal a perineal) [38] (Figura 2). Hadidi dividió el hipospadias en tres categorías: glanular, distal (de penano distal a mesopeneano) y proximal (de peneano proximal a perineal) [39]. Estas clasificaciones ayudan a categorizar el hipospadias en función de la ubicación meatal, ofreciendo un marco sobre el cual registrar los hipospadias. Sin embargo, la ubicación del meato por sí sola es insuficiente para representar adecuadamente la verdadera gravedad del hipospadias, debido a que el grado de curvatura ventral y calidad de la placa de uretra también influyen en la complejidad de la corrección y en el pronóstico. En la actualidad, se requiere una mayor estandarización para la clasificación del hipospadias [40].

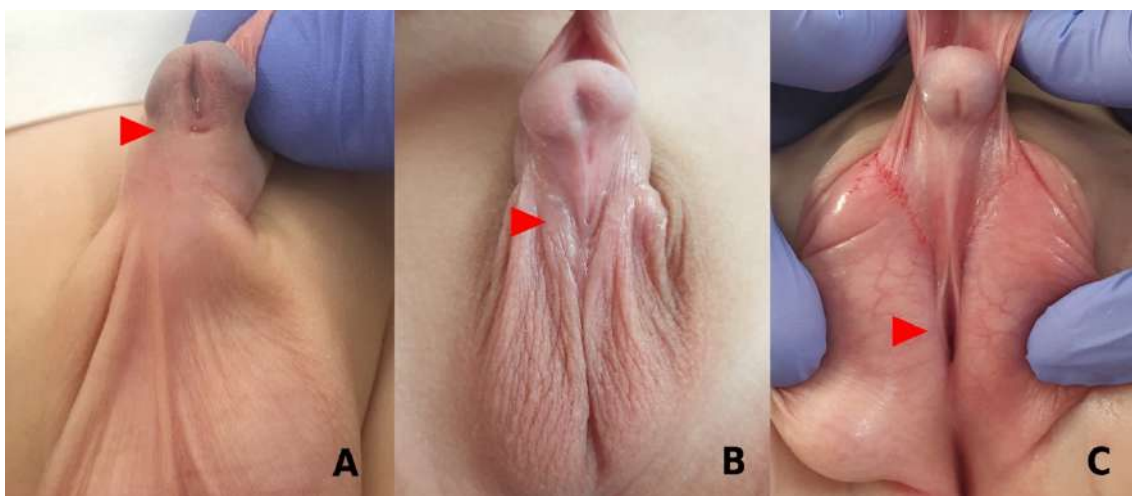


Figura 2: Ejemplos de las categorías de hipospadias según la clasificación de Duckett (Las flechas rojas muestran la posición del meato uretral). (A) Hipospadias anterior con meato a nivel subcoronal. (B) Hipospadias medio con meato

OBJETIVOS DE LA CORRECCIÓN QUIRÚRGICA DEL HIPOSPADIAS

El hipospadias no es una patología que suponga un riesgo vital para el individuo, sin embargo, está muy bien descrito que puede provocar problemas importantes en la micción, la eyaculación, las relaciones sexuales y problemas psicológicos en determinados individuos [41]. Por tanto, los objetivos de la corrección del hipospadias incluyen: (1) La corrección de la curvatura peneana u ortoplastia, para permitir unas relaciones sexuales normales. (2) La reconstrucción de la uretra o uretroplastia, que permita una micción y eyaculación adecuadas. (3) La cobertura cutánea del pene o plastia cutánea, para conseguir una apariencia estética normal y evitar problemas psicosexuales en el paciente.

TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Más de 300 técnicas diferentes se han descrito para la reparación del hipospadias y además éstas siguen cambiando y evolucionando en la actualidad. No existe por tanto un consenso sobre cuales son las mejores técnicas a aplicar, y la elección de la misma se basa en fenotipo específico del hipospadias y la preferencia del cirujano, siempre cumpliendo los objetivos básicos de conseguir una buena ortoplastia, uretroplastia y plastia cutánea [42].

CORRECCIÓN DE LA CURVATURA PENEANA

La curvatura del pene puede ser el resultado de varios de factores, que incluyen: la fijación anómala de la piel del cuerpo peneano a las estructuras subyacentes; el anclaje de la placa uretral a los cuerpos cavernosos; la existencia de tejido de cuerpo esponjoso atrésico que extiende desde el meato anormal al glande; o una deformidad intrínseca de los cuerpos cavernosos (Figura 3). La corrección de la curvatura peneana del pene puede implicar una serie de pasos, que debe abordarse en el siguiente orden: (1) “*degloving*” o desnudamiento del pene movilizándolo totalmente la piel que lo recubre y disecando el dartos. En la mayoría de los pacientes (80%), sólo se requiere de esta maniobra para corregir la curvatura peneana. (2) Si la curvatura es menor o igual a 30 grados después de la disección ventral, se puede corregir mediante la plicatura dorsal línea media (procedimiento de Baskin). (3) Si la curvatura es mayor o igual a 30 grados después de la disección ventral, se debe de realizar una sección de la placa uretral. (4) Si la curvatura persistente después de la sección de la placa y ésta es menor o igual a 30 grados se puede realizar una plicatura dorsal en línea media (Baskin); (5) y si es mayor o igual a 30 grados se puede corregir mediante una incisión única ventral sobre el cuerpo cavernoso y posterior cobertura del defecto con injerto, o múltiples incisiones corporales ventrales sin injerto (corporotomía ventral) [43].



Figura 3: Curvatura peneana en un caso de hipospadias tras el denudamiento del pene y disección de la uretral. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).

Cuando se ha completado la corrección de la curvatura peneana del pene y se confirma con una prueba de erección artificial con solución salina, se procede a reconstruir la uretra. No debe de realizarse la corrección de la uretra sin antes corregir la curvatura completamente.

RECONSTRUCCIÓN DE LA URETRA (URETROPLASTIA)

Clásicamente la reconstrucción de la uretra se puede realizar en un tiempo o en un procedimiento de dos tiempos. La mayoría de los cirujanos optan por una reparación de una sola etapa, siempre que sea posible. Como regla general, una reparación en un solo tiempo es apropiada para los hipospadias distales, mesopeneanos y proximales sin curvatura significativa. La reparación en dos tiempos se reserva generalmente para hipospadias penoescrotales y perineales con curvatura peneana grave, así como para caso multioperados recidivantes [1, 39, 43]. A continuación se describen brevemente las técnicas más comúnmente utilizadas.

- **AVANCE URETRAL (MAGPI)**

El procedimiento MAGPI, acrónimo de *“meatal advancement and glanuloplasty incorporated”* (avance meatal y glanuloplastia incorporada), fue descrito originalmente por Duckett [44]. Consiste en una remodelación del glande del pene y un pequeño avance del meato. Sólo es apto para los casos de hipospadias leves en los que la uretra es móvil, lo que puede corroborarse mediante una tracción simple del meato hasta la punta del glande. Para realizar la técnica, se crea una incisión vertical entre la punta del glande y el meato y luego se cierra transversalmente,

avanzando de esta forma el meato. Se realiza una incisión circunferencial en la piel por debajo de la corona y el meato. La glanuloplastia se realiza entonces en dos capas, y finalmente el pene es circuncidado y se cierra la piel. Tras el procedimiento es opcional dejar una sonda vesical (Figura 4).

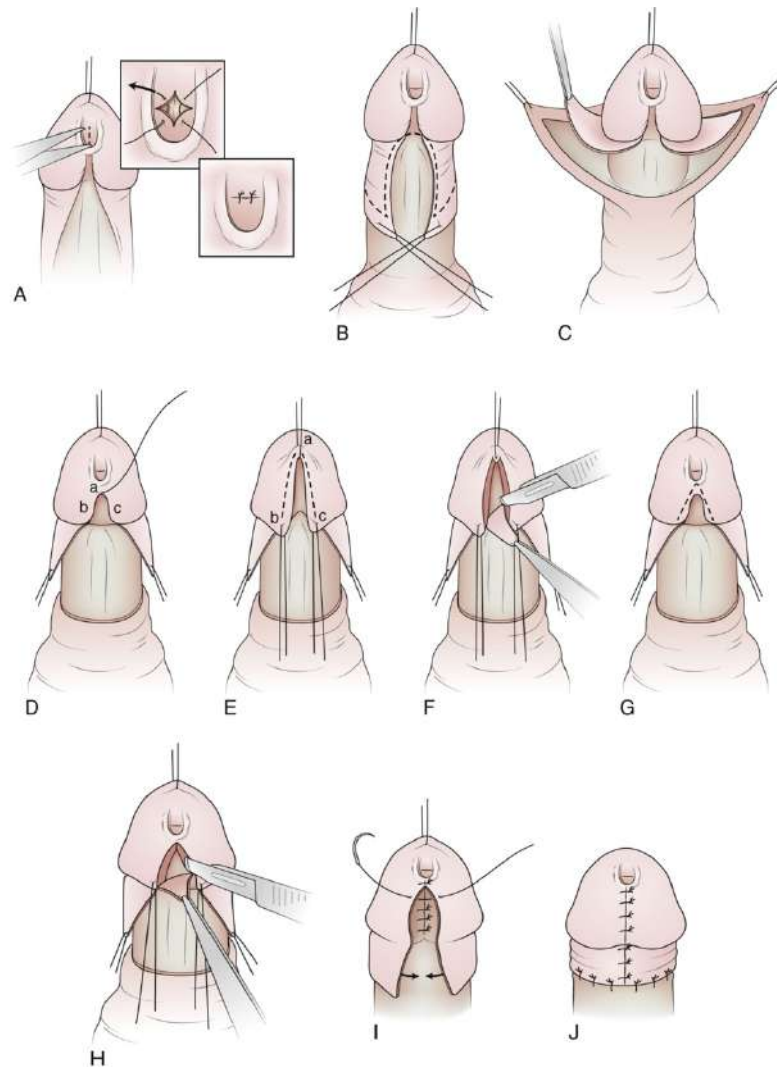


Figura 4: Avance uretral MAGPI. (Fuente: Partin AW, Peters CA, Kavoussi LR, Dmochowski RR, Wein AJ. Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020)

- **TUBULIZACIÓN DE LA PLACA URETRAL**

Actualmente la reparación en una sola etapa más ampliamente utilizada es un tubulización de la placa uretral, con la incorporación de una incisión vertical en el dorso de la placa, descrita por Snodgrass [45], y se conoce con el nombre de TIP (tubularized incised plate). En este procedimiento la placa uretral es primero delimitada y posteriormente escindida mediante una incisión media longitudinal. Una vez que la curvatura peneana se ha corregido, la placa escindida se tubuliza alrededor de una sonda. Esta incisión permite que la placa uretral que se tubulice sin tensión. Se ha evidenciado que se produce una epitelización de la incisión de la placa uretral después de varios días y de esta forma se consigue un tubo completo de epitelio que conforma

la neouretra. Algunos cirujanos prefieren una modificación de la técnica, en la que un injerto libre de piel prepucial o de mucosa oral es incrustado dentro de la incisión en la placa uretral para reducir el riesgo de contracción y estenosis de la neouretra [46]. Si la placa uretral es suficientemente amplia y flexible para ser tubulizada sobre un catéter de 8 Fr, puede realizarse sin la incisión de placa uretral (procedimiento de Thiersch-Duplay) [39]. Una vez formada la neouretra, un pedículo vascularizado sin epitelio se coloca sobre la anastomosis para reducir el riesgo de fístulas. Posteriormente se realiza una glanuloplastia mediante reaproximación de las alas del glande en dos capas. La piel se recoloca, asegurándose una cobertura de la superficie ventral del pene para evitar la recurrencia de la incurvación. El catéter uretral se suele dejar durante 7 días (Figura 5).

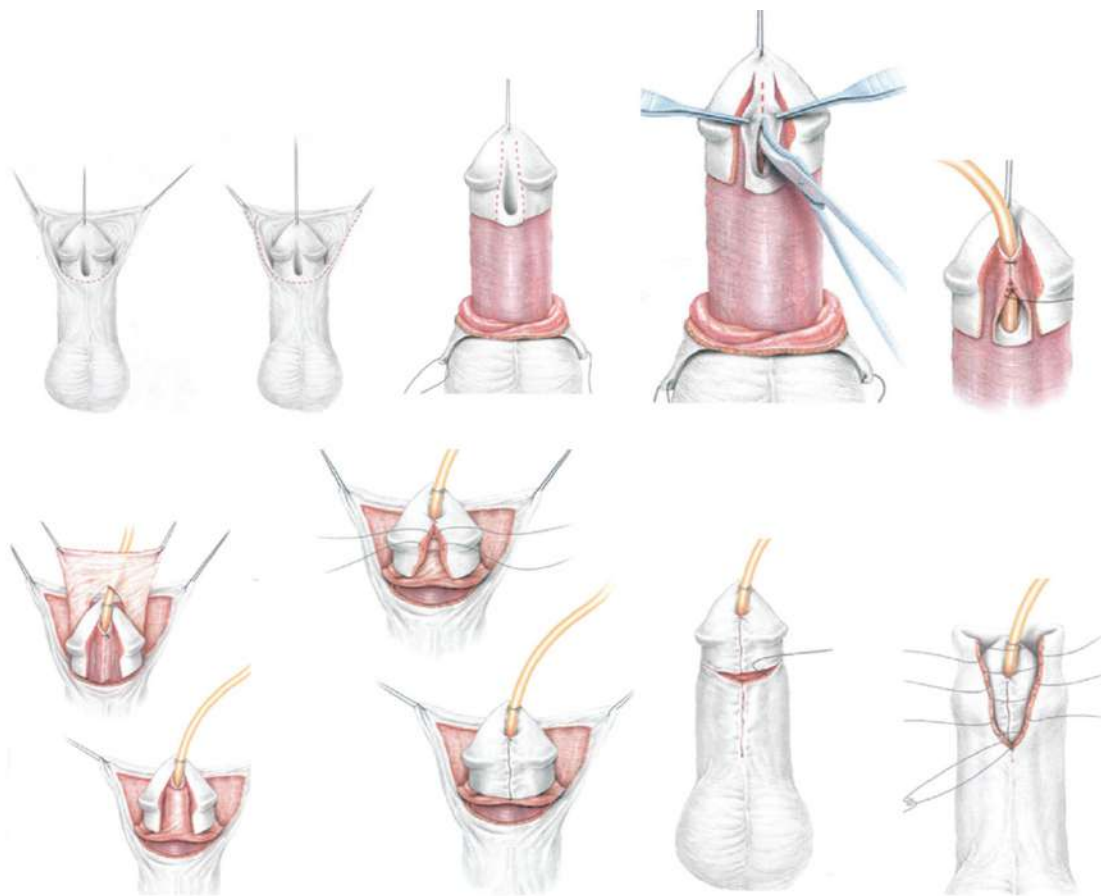


Figura 5: Uretroplastia tipo TIP o procedimiento de Snodgrass. (Fuente: Snodgrass WT. Snodgrass technique for hypospadias repair. *BJU Int.* 2005 Mar;95(4):683-93)

- COLGAJO CON BASE MEATAL (PROCEDIMIENTO DE MATHIEU)

Esta técnica consiste en la creación de un colgajo de piel del pene proximal, dejando el meato como la base del colgajo. Se realiza una incisión alrededor de la placa uretral que se extiende hacia el glande creando dos colgajos laterales en éste. El colgajo se coloca entonces sobre la placa uretral y se suturan los bordes laterales al mismo. Se utiliza tejido subcutáneo adyacente para cubrir ('impermeabilizar') las líneas de sutura. Tras crear la neouretra se lleva a cabo una glanuloplastia (Figura 6). Se deja una sonda uretral durante 4-7 días, aunque algunos autores

han refieren que no es necesario. Como regla general, la longitud máxima de este colgajo no debería ser más de tres veces la anchura de la base y en la práctica esta técnica es inadecuada para una uretroplastia superior a 1,5 cm [39].

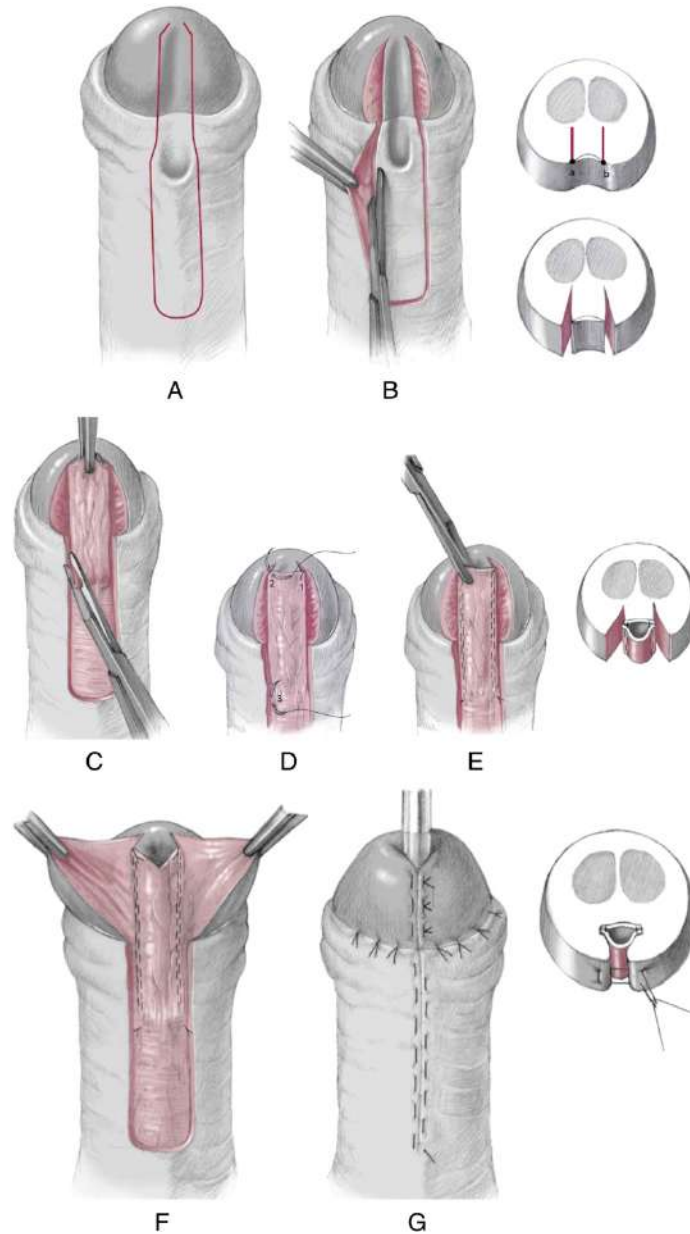


Figura 6: Técnica de uretroplastia de colgajo con base meatal. Procedimiento de Mathieu. (Fuente: Hadidi AT. The slit-like adjusted Mathieu technique for distal hypospadias. J Pediatr Surg. 2012 Mar;47(3):617-23)

- **TÉCNICAS BASADAS EN COLGAJOS PREPUCIALES (PROCEDIMIENTOS DE ONLAY, DUCKETT Y KOYANAGI)**

Los procedimientos basados en colgajos prepuciales fueron descritos inicialmente por Duckett [47], quien ingeniosamente describió la técnica de disección del tejido prepucial en 2 hojas para así crear un colgajo pediculado a partir de la mucosa prepucial interior para la reconstrucción uretral.

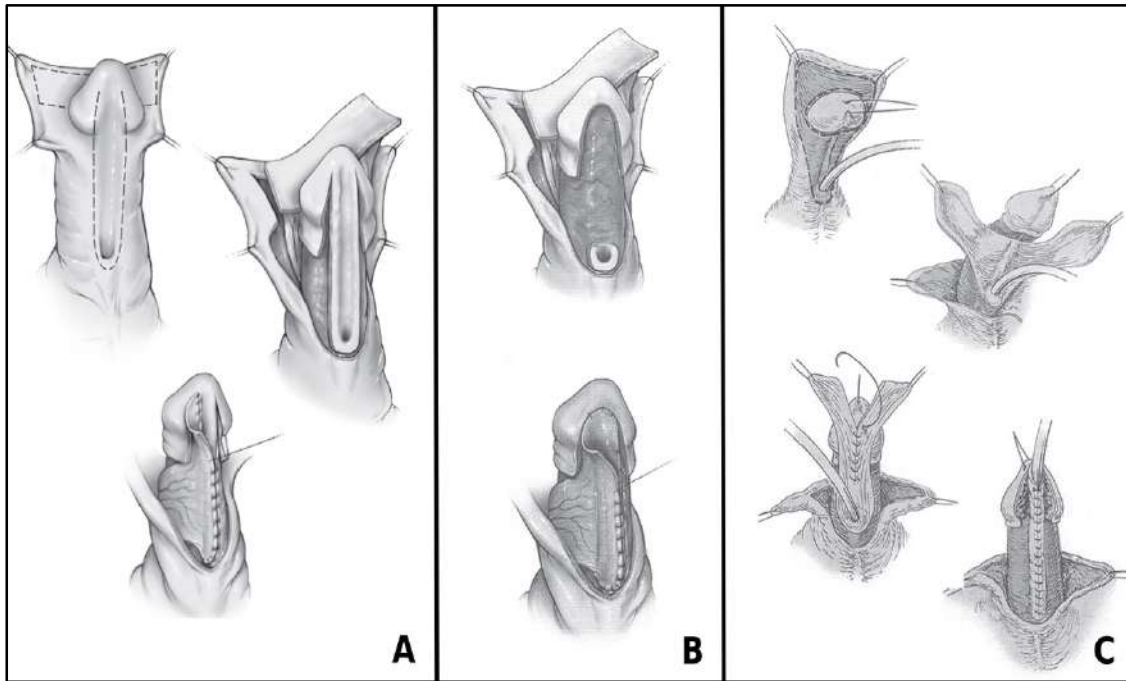


Figura 7: Técnicas de uretroplastia basadas en colgajos prepuciales: (A) Procedimiento de Onlay. (B) Procedimiento de Duckett. (C) Procedimiento de Koyanagi. (Fuente: McDougal WC, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. Campbell's Urology. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2012)

El **procedimiento de Onlay** consiste en la colocación de dicho colgajo prepucial sobre la placa uretral para crear la cara ventral de la uretra y así completar el cilindro uretral [48] (Figura 7-A). Para llevar a cabo el procedimiento se realizan dos incisiones paralelas verticales para delimitar la placa uretral. Desde una incisión circunferencial subcoronal, se realiza el denudamiento del pene hasta la base. Una vez completado esto se realiza la corrección de la curvatura del pene si ésta existe. Se crean dos solapas en el glande y la uretra proximal adelgazada se corta hasta hallarse el tejido uretral normal. Se disecciona el colgajo prepucial según la técnica descrita por Duckett y éste se lleva, rodeando el pene, a su superficie ventral y se sutura a la placa uretral. Una vez que la neouretra ha sido creada, el pedículo subcutáneo del colgajo se ancla a la albugínea, lateral a la anastomosis uretral. Este colgajo subcutáneo cubre la anastomosis y proporciona una cobertura para la neouretra.

En los casos que es necesario seccionar la placa uretral con el fin de corregir la curvatura se puede optar por tubularizar el colgajo prepucial para crear un cilindro uretral completo a partir del colgajo. Esta técnica se denomina **Procedimiento de Duckett** [47] (Figura 7-B).

El **procedimiento Koyanagi** y sus variantes [49] son procedimientos alternativos para hipospadias proximales. Su objetivo es el uso de la placa uretral y los tejidos ventrales adyacentes en continuidad con la mucosa prepucial, los cuales se transfieren ventralmente con su pedículo. Este material amplio y bien vascularizado se libera de la cara ventral del cuerpo esponjoso hasta la base del pene. Esto permite enderezar el pene y construir una placa amplia que posteriormente se tubuliza (Figura 7-C).

• URETROPLASTIA EN DOS TIEMPOS

Este procedimiento fue inicialmente descrito por Bracka [50]. El primer tiempo de corrección consiste en corregir la curvatura del pene, preparar el glande y extraer un injerto para crear una placa uretral. Una vez que la curvatura se ha corregido, se realiza una incisión ventral en línea media del glande desde la parte más dorsal del nuevo meato al meato actual. Se crean dos alas en el glande para abrirlo ampliamente. El material ideal para el injerto es aquél que sea fácil de obtener, sin dejar un defecto cosmético a largo plazo. Debe ser flexible y lampiño. El material de injerto más comúnmente utilizado es la mucosa interior del prepucio. También se puede utilizar Injertos de piel retroauricular (injerto de Wolfe) para la reparación primaria. La mucosa oral y vesical se utilizan también con bastante frecuencia y tienen un papel muy importante en la reparaciones de hipospadias multioperados o con defectos amplios.

Después de extraer el injerto se eliminan el tejido graso y subepitelial para facilitar la revascularización del tejido. El injerto se fija con suturas absorbibles al glande, al cuerpo peneano y al meato uretral en la base. Posteriormente se hacen pequeñas incisiones en el injerto para crear ventanas que permitan el drenaje de hematomas. Se aplica un apósito firme, con un catéter, que sostiene el injerto en su sitio y minimiza la formación de hematomas. Después de 1 semana se quitan el vendaje y el catéter (Figura 8).

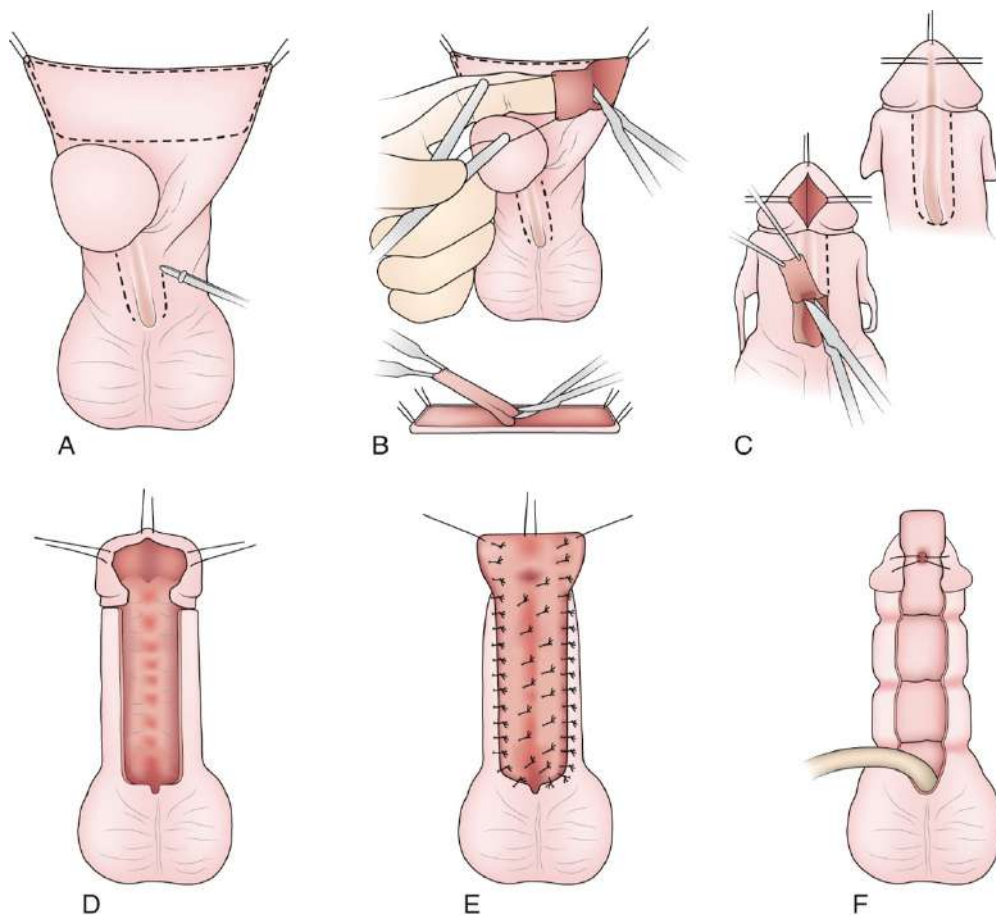


Figura 8: Primer tiempo de uretroplastia según técnica de Bracka. (Fuente: Partin AW, Peters CA, Kavoussi LR, Dmochowski RR, Wein AJ. *Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020*)

El segundo tiempo de la reparación se lleva a cabo generalmente después de 6 meses. Este paso implica tubulización del injerto para formar la neouretra y posteriormente la colocación de una segunda capa vascularizada sobre la anastomosis. Una vez realizado lo anterior, el glande se reconstruye y la piel del pene se cierra.

PLASTIA DE PIEL PENEANA

Cuando la uretra ya ha sido reconstruida, es necesario volver a crear el meato y glande. La glanuloplastia se realiza poniendo las dos alas del glande alrededor de la uretra cubriéndola, y el glande se cierra entonces en dos capas. El extremo distal de la neouretra se sutura al nuevo meato, creando así una hendidura meatal. Una vez completado esto, la mucosa interna del prepucio residual adyacente al surco coronal se lleva alrededor de la cara ventral del pene para crear una mucosa circunferencial a modo de 'puño "o" cuello "que rodea el glande. La cobertura de la piel se realiza moviendo el exceso de piel de la cara dorsal a la cara ventral. Para ello generalmente se realiza una incisión en la línea media de la piel dorsal desde distal creándose dos colgajos laterales de piel que se denominan colgajos de Byars [1, 39].

COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO DEL HIPOSPADIAS.

A continuación se resumen las principales complicaciones del tratamiento quirúrgico del hipospadias con las técnicas convencionales [1,39, 51].

COMPLICACIONES TEMPRANAS

Las intervenciones para corregir el hipospadias conllevan riesgos de complicaciones que son comunes a todas las intervenciones quirúrgicas, pero que pueden afectar gravemente el resultado final del procedimiento. Debido a la copiosa vascularización del pene, una complicación temprana frecuente es la hemorragia. Intraoperatoriamente, la hemorragia puede ser controlada mediante un torniquete, el uso de adrenalina, o con coagulación bipolar. Tras la intervención, la hemorragia puede evitarse y controlarse con un vendaje compresivo; lo cual también ayuda a reducir el edema postoperatorio que se produce muy frecuentemente en estas intervenciones. El vendaje compresivo es esencial para minimizar la formación de hematomas, ya que esto puede actuar como foco de infección y formación de fístulas posteriores. La hemostasia y la manipulación metódica de tejidos es primordial para evitar infecciones de la herida. La infección, formación de hematomas, así como los colgajos isquémicos, pueden llevar a la mala cicatrización de la herida, lo que puede producir fístulas y/o ruptura completa de la reparación. La dehiscencia completa de la reparación es afortunadamente rara, pero cuando aparece, precisa de una reparación secundaria o de rescate que suele ser más compleja que la reparación inicial.

COMPLICACIONES TARDÍAS

Las complicaciones a largo plazo de la cirugía de hipospadias son bien conocidas y desafortunadamente demasiado comunes. Su incidencia depende de la gravedad del hipospadias, del procedimiento realizado y de la habilidad y experiencia del cirujano.

- FÍSTULAS

Las fístulas son las complicaciones más comunes después de la cirugía de hipospadias, y puede ocurrir en hasta el 30% de los pacientes. Una fístula puede presentarse de forma aguda inmediatamente después se retira el catéter, o muchos años después de la reparación. Si la fístula aparece de forma aguda una opción de tratamiento es la recolocación del catéter durante 14 días con el fin de permitir que se cierre de forma espontánea. Aunque este enfoque puede ser eficaz, muchas fístulas primarias persisten y requieren tratamiento adicional. La ubicación de una fístula de hipospadias es variable, pero el sitio donde ocurre más frecuentemente es en el surco balanoprepucial, especialmente en los casos distales. En ocasiones se producen fístulas grandes o múltiples, lo que indica que la uretroplastia original fue insatisfactoria y debe repetirse.

Antes de intentar reparar una fístula es imperativo excluir estenosis uretrales meatales y/o distales, ya que esto predispone a la recurrencia de la fístula. Las fístulas a veces se asocian a divertículos uretrales, que requieren ser extirpados en el momento de la reparación de la fístula.

La reparación de las fístulas de hipospadias no debe tratarse a la ligera y en algunas series se ha descrito un porcentaje de recurrencia de hasta el 50%. El momento del cierre de la fístula es importante. Aunque el cierre temprano se recomendaba en el pasado, ahora se recomienda esperar un intervalo de al menos 6 meses desde la reparación original para el intento de cierre de la fístula. Se han descrito muchas técnicas. El cierre simple, que consiste en refrescar y luego cerrar los bordes de la fístula y la piel que lo recubre, se asocia con una alta tasa de recurrencia y no se recomienda. La reparación basada en colgajos también se ha descrito, en el que la fístula se disecciona de la uretra y el defecto uretral es cerrado mediante la inserción de suturas absorbibles. A continuación se forma un colgajo de piel de la que se crea una capa subcutánea vascularizada y se coloca sobre la reparación uretral. Una vez que la uretra está cubierta, el colgajo de piel se hace avanzar para cerrar el defecto de la piel. Con esta técnica, descrita por Duckett, se ha registrado un porcentaje de éxito del 90% [38].

En algunos casos, la fístula es muy grande y representa un fallo de la uretroplastia original. En estos casos, la cirugía que se limita a cierre de la fístula está generalmente condenada al fracaso, y en estas circunstancias se requiere la repetición de la uretroplastia. El uso de una sonda vesical después de la reparación de la fístula es muy debatida y la tasa de éxito en los sondados y no sondados parece muy similar en la mayoría de series. Por lo tanto, a menos que haya alguna dificultad de la micción postoperatoria, es posible realizar una reparación de la fístula sin drenaje de la vejiga.

- ESTENOSIS DEL MEATO

La estenosis del meato puede ser secundaria a una isquemia de las solapas del glande o a movilización inadecuada de éstas. Se puede presentar como una dificultad para la micción, asociada a un flujo urinario reducido o disperso, o con infecciones del tracto urinario secundarias al vaciado incompleto de la vejiga. Este problema puede tratarse inicialmente mediante dilatación del meato, que puede realizarse ambulatoriamente o bajo anestesia. Si fracasa la dilatación entonces estaría indicado realizar una meatotomía quirúrgica.

- ESTENOSIS URETRAL

La estenosis uretral consiste un estrechamiento en algún punto de la neouretra que puede ir asociado a una fístula que aparece por aumento de la presión. La estenosis pueden ocurrir en cualquier punto a lo largo de la uretroplastia, pero más comúnmente ocurren en los extremos distal y proximal de la neouretra que son los puntos más críticos de fibrosis. Esta complicación se ha reducido en los últimos años con las técnicas quirúrgicas actuales dado que se evita realizar anastomosis circulares. La estenosis distal puede ser tratada con dilatación regular, pero en casos graves una reparación quirúrgica completa es necesaria. La estenosis proximal es una complicación grave que, a menudo requiere la reconstrucción de la uretra en ese punto o de la uretra completa.

- CURVATURA PENEANA PERSISTENTE

La persistencia de la curvatura peneana después de la reparación de hipospadias suele ser una complicación debida a una corrección inadecuada en el momento de la reparación inicial. En raros casos, sin embargo, puede ser la consecuencia de una fibrosis postoperatoria. Esta complicación es posible evitarla aplicando una buena técnica de corrección y mediante la confirmación de la corrección con una prueba de erección artificial intraoperatoria. La corrección de la curvatura persistente consiste en realizar un denudamiento completo del pene para excluir la tracción de la piel o fibrosis como la causa de incurvación. Si se observa la persistencia de curvatura después de esta maniobra, la plicatura dorsal de la túnica del albugínea suele ser suficiente para corregirla. En casos más severos puede ser necesaria la sección uretral y re-uretroplastia.

- BALANITIS XERÓTICA OBLITERANTE

Esta es una complicación rara causada por una inflamación crónica y fibrosis del glande y del meato uretral, provocando una cicatrización anómala y estenosis del meato. También se conoce como liquen escleroso. Los corticoides tópicos pueden ser suficientes para su tratamiento, pero en algunos casos es necesario realizar una meatoplastia o incluso re-uretroplastia.

- URETRA PILOSA

La presencia de pelos dentro del lumen de la neouretra es una consecuencia de la utilización de piel pilosa para la uretroplastia. La presencia de pelos puede complicarse con la aparición de litiasis e infecciones. El uso de tejidos lampiños para la reconstrucción uretral puede evitar esta complicación. Para los pacientes con una uretra con pelos que produce síntomas, el único tratamiento efectivo es una re-uretroplastia.

- URETROCELE

Consiste en el desarrollo de una sección dilatada o “*balonada*” de la neouretra; a menudo como resultado de la obstrucción distal que da lugar a la distensión por aumento de la presión de la neouretra proximal. También puede deberse a la ausencia o deficiencia de tejido esponjoso en la neouretra que funcione de soporte. Clínicamente se presenta como un flujo urinario escaso, goteo terminal, infecciones del tracto urinario, dilatación de la cara ventral del pene en el momento de la micción y cálculos uretrales. El tratamiento quirúrgico requiere la escisión del tejido uretral redundante y tratamiento de la estenosis distal si existe.

RESULTADOS DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO CONVENCIONAL

Los resultados de la reparación de hipospadias dependen de la gravedad original del defecto y el tipo de operación realizada.

TUBULIZACIÓN DE LA PLACA URETRAL

La técnica de tubulización descrita por Thiersch-Duplay, tiene una tasa de reintervención de alrededor del 10%, principalmente por fístulas uretrales [39, 51]. Esta técnica tiene la ventaja de crear un meato hendido, que es mejor cosméticamente. El resultado después de la reparación con la técnica de Snodgrass (TIP) tiene resultados similares. En un metanálisis se estudiaron las complicaciones tras la reparación TIP [54]. Se incluyeron en el análisis 49 estudios (4.675 pacientes). El porcentaje de fístulas y de reintervenciones fueron significativamente mayores en las reparaciones secundarias (15,5% y 23,3%) en comparación con las primarias proximales (10,3% y 12,2%) y primarias distales (5,7% y 4,5%) ($p=0,045$ y $p<0,001$, respectivamente). Las modificaciones técnicas redujeron las tasas de fístula de 10,3% a 3,3% ($p=0,003$) y las tasas de reintervención del 13,6% al 2,8% ($p=0,001$). El porcentaje de estenosis meatal fue más alto en las reparaciones secundarias, con un seguimiento mayor a 1 año (12,7%). La comparación de la situación geográfica mostró que los porcentajes de complicaciones para casi todas las variables fueron significativamente más bajos en Norteamérica en comparación con Europa y el resto del mundo. La media de porcentaje de estenosis del meato fueron de 1,8% en Norteamérica, un 3,4% en Europa y un 8,2% en el resto del mundo ($p=0,002$). Esto siguió siendo significativo en un modelo multivariante incluyendo la técnica de reparación y duración del seguimiento ($p=0,046$). Las medias de porcentaje de estenosis de uretra, fístula y reoperación siguieron un

patrón similar ($p=0,045$, $p=0,009$ y $p<0,001$, respectivamente). La media de seguimiento fue menor en el grupo de Norteamérica, de 11,9 meses, en comparación con Europa, a 17,8 meses, y el resto del mundo, en 18,9 meses. El presente meta-análisis ha demostrado que los porcentajes de complicaciones más bajos para la reparación TIP se obtienen cuando se aplica a la reparación del hipospadias distal primario. Los porcentajes de complicaciones son mayores para todas las variables cuando se utiliza la reparación TIP para los hipospadias proximales primarios. Se han documentado porcentajes de complicaciones más bajos en algunos estudios utilizando una reparación por etapas para la corrección de hipospadias proximales primarios o secundarios, en comparación con la técnica TIP, lo que implica que un enfoque por etapas puede ser superior a la reparación TIP en estos casos. La información sobre el tiempo de seguimiento fue limitada, por lo que la evaluación del impacto del tiempo del seguimiento fue difícil. La localización geográfica tuvo un efecto notable en los resultados, siendo menor el porcentaje de complicaciones en Norteamérica, con respecto a los otros grupos. La media de seguimiento fue menor en Norteamérica, lo que sugiere que el seguimiento a corto plazo en los estudios de América del Norte puede haber dado lugar a una menor notificación de complicaciones tardías.

AVANCE URETRAL

Duckett informó de su experiencia con el procedimiento MAGPI para la corrección de hipospadias glanular en su serie de más de 1.000 pacientes [53]. De éstos, sólo el 1,2% requirió un procedimiento secundario. Sin embargo, la dehiscencia parcial del meato es un problema relativamente común con este procedimiento y conduce a un resultado cosmético inferior.

COLGAJOS PEDICULADOS

En la reparación de **Mathieu** las estenosis distales son poco frecuentes (1%), en comparación con la técnica TIP; y las fístulas ocurren en aproximadamente el 5% de los casos, ligeramente más frecuentes que con la técnica TIP [54]. Sin embargo, el resultado cosmético suele ser inferior al TIP.

En cuanto a los **colgajos prepuciales** constituyen unas técnicas de reparación que a menudo se reservan para los casos más complejos de hipospadias, en consecuencia, la proporción de complicaciones es mayor. Hay una amplia variabilidad de los porcentajes de fístula publicados, del 4% al 69% [51]. También se ha descrito curvatura peneana recurrente que aparece en edades tardías en un 32,5% de esos pacientes [55]. Por tanto, el seguimiento a largo plazo está recomendado.

REPARACIÓN EN 2 TIEMPOS

Bracka ha revisado su serie personal de 600 pacientes tratados mediante la técnica en dos tiempos [56]. En la mayoría de los casos, la neouretra se realizó a partir de un injerto libre derivado de mucosa prepucial. El primer tiempo de intervención requirió revisión en el 4% de

los pacientes, por curvatura peneana persistente o para aumentar el área de la piel en la zona meatal, mientras que las complicaciones del segundo tiempo fueron fístulas en el 6% de los pacientes, con una mayor tasa de fístula (de 10%) en casos reintervenidos, en comparación con procedimientos primarios (3%). Un mayor porcentaje de fístulas fue encontrado en pacientes operados en la primera parte de la serie, antes de la introducción de un colgajo vascularizado de dartos entre neouretra y la piel. Se produjeron estenosis uretrales en el 7% de los pacientes. Esta cifra se debió, en parte, a presencia de balanitis xerótica obliterante. Los resultados funcionales a largo plazo tras la reparación en dos etapas se ha estudiado en varios centros. En un estudio prospectivo del mismo autor un total de 43 pacientes fueron operados según la técnica de Bracka, de los cuales 30 pacientes completaron la reparación en 2 tiempos. La edad media de los pacientes fue de 4 años y 8 meses. Se logró un 100% de prendimiento del injerto y no se requirió ninguna revisión. Tres pacientes desarrollaron fístula, mientras que dos tenían estenosis meatal. No se encontraron dehiscencias de glande, estenosis uretral o chorda residual durante el seguimiento y los resultados estéticos fueron satisfactorios, alcanzándose buen flujo de orina en todos los casos [57].

B. HISTOLOGÍA DE LA URETRA

HISTOLOGÍA DE LA URETRA HUMANA

La uretra es el conducto final a través del cual pasa la orina desde la vejiga al exterior. La anatomía de la uretra difiere en hombres y mujeres.

La uretra femenina humana es corta, mide aproximadamente 5 cm de largo. Va desde la vejiga y se abre hacia el exterior en la línea media del vestíbulo genital, justo entre el clítoris y el borde superior del introito vaginal. Está revestida principalmente por epitelio escamoso estratificado y su lámina propia contiene muchos canales vasculares, así como algunas pequeñas glándulas secretoras de moco. Aunque la pared muscular uretral es una continuación del músculo liso involuntario de la vejiga, existe un esfínter, el esfínter externo. Este está compuesto por músculo estriado y está bajo control voluntario; se encuentra alrededor de la porción media de la uretra, donde pasa a través de los músculos estriados del suelo pélvico [58].

La uretra masculina mide 20-25 cm de largo y es más compleja que la uretra femenina, ya que tiene dos propósitos: es el conducto final del sistema urinario y el conducto terminal del sistema reproductor masculino. Se puede dividir en tres segmentos: uretra prostática, uretra membranosa y uretra esponjosa o peneana (Figura 9):

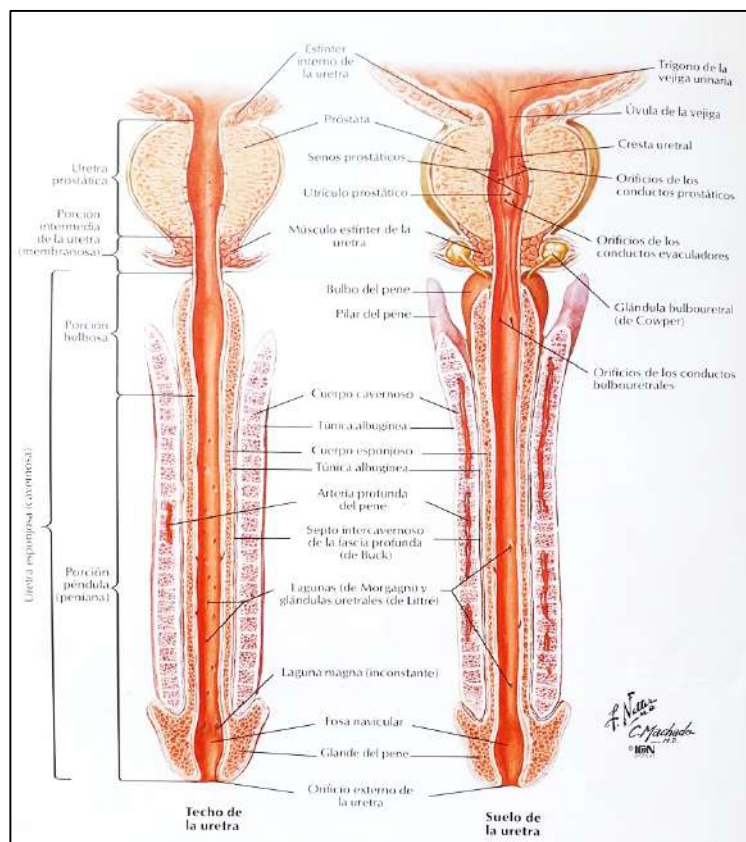


Figura 9: Uretra masculina donde se detallan sus 3 segmentos: uretra protática, uretra membranosa y uretra esponjosa. (Fuente: Netter FH. Atlas de Anatomía Humana.. 3ª Edición. Barcelona, España, Masson, S.A.; 2003).

- **Uretra prostática:** De tres a 4 cm de largo, se encuentra completamente en la glándula prostática. Está revestido por un epitelio de transición y recibe las aberturas de muchos conductos diminutos de la próstata, el utrículo prostático (el homólogo rudimentario del útero) y los conductos eyaculatorios emparejados.

- **Uretra membranosa:** De uno a 2 cm de largo. Este segmento se llama así porque atraviesa el periné. Está revestido por epitelio columnar estratificado intercalado con parches de epitelio columnar pseudoestratificado. Las fibras del músculo esquelético del periné forman un esfínter alrededor de esta porción de la uretra, que proporciona control voluntario sobre la micción.

- **Uretra esponjosa (uretra peneana):** La porción más larga de la uretra (15 cm de largo), pasa a lo largo del pene y termina en la punta del glande como el orificio uretral externo. Este segmento se llama así porque se encuentra en el cuerpo esponjoso. Está revestido por epitelio columnar estratificado intercalado con parches de epitelio columnar pseudoestratificado y escamoso estratificado, no queratinizado (Figura Y). La porción terminal de la uretra en el glande del pene (la fosa navicular) está revestida por epitelio escamoso estratificado no queratinizado.

La lámina propia de las tres regiones está compuesta por un tejido conectivo fibroelástico laxo con abundante irrigación vascular (Figura 10). Alberga numerosas glándulas de Littre, cuya secreción mucosa lubrica el revestimiento epitelial de la uretra [58].

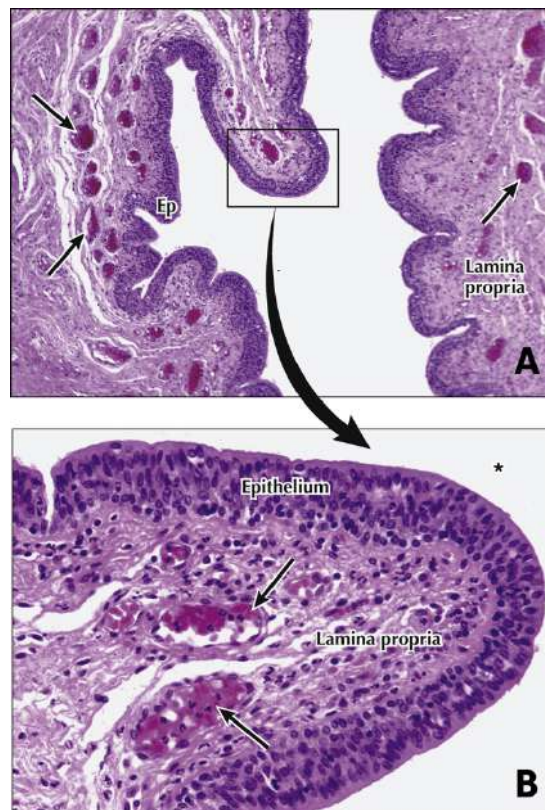


Figura 10: Imagen histológica de la uretra peneana o esponjosa: (A) Imagen a baja magnificación que muestra el epitelio de transición columnar estratificado y pseudoestratificado con sus pliegues, así como la lámina propia rica en vascularización. (B) Imagen a mayor magnificación que muestra el detalle del epitelio columnar estratificado, así como la lámina propia con plexos vasculares (flechas). (Fuente: Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's Essential Histology: with Correlated Histopathology*, Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2021).

HISTOLOGÍA DE LA URETRA DEL CONEJO BLANCO GIGANTE DE NUEVA ZELANDA

La estructura histológica del pene del conejo blanco gigante de Nueva Zelanda es muy similar a la histología uretral humana, y por tanto, esta especie animal ha sido ampliamente usada en múltiples estudios relacionados con el diseño de implantes uretrales, pruebas de medicamentos y procedimientos quirúrgicos de la uretra [59].

La uretra del conejo se divide en 2 secciones principales: uretra pélvica y uretra peneana (Figura 11). La uretra pélvica se divide en uretra pre-prostática y uretra prostática. La uretra peneana está rodeada por cuerpo esponjoso como en el humano y también es conocida como uretra esponjosa. El cuerpo cavernoso se encuentra dorsal a la uretra como en el humano (Figura 12 y Figura 13).

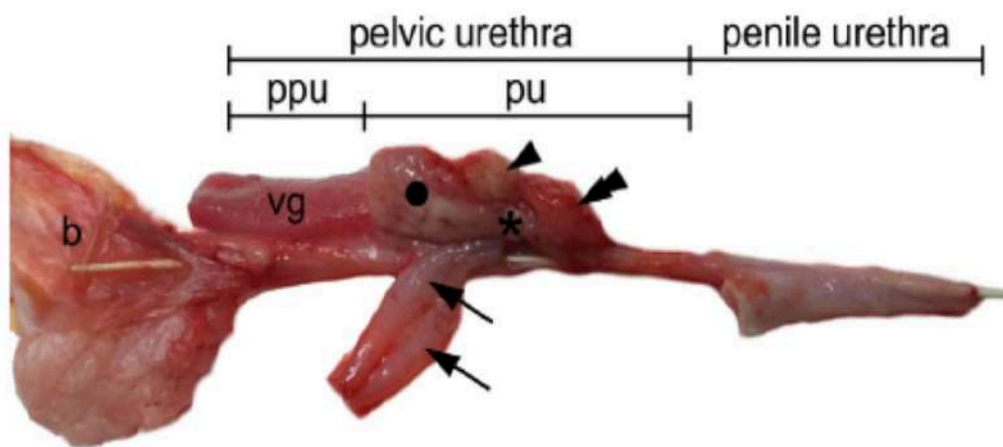


Figura 11: Imagen anatómica de la uretra de conejo donde se aprecia los segmentos uretrales: (Pelvic urethra) uretra pélvica con su secciones de uretra pre-prostática (ppu) y prostática (pu). (Penile urethra) uretra peneana. (b) Vejiga. (vg) Glándula vesical seminal. (Fuente: Skonieczna J, Madej JP, Kaczmarek-Pawelska A, Będziński R. Histological and morphometric evaluation of the urethra and penis in male New Zealand White rabbits. *Anat Histol Embryol.* 2021 Jan;50(1):136-143).

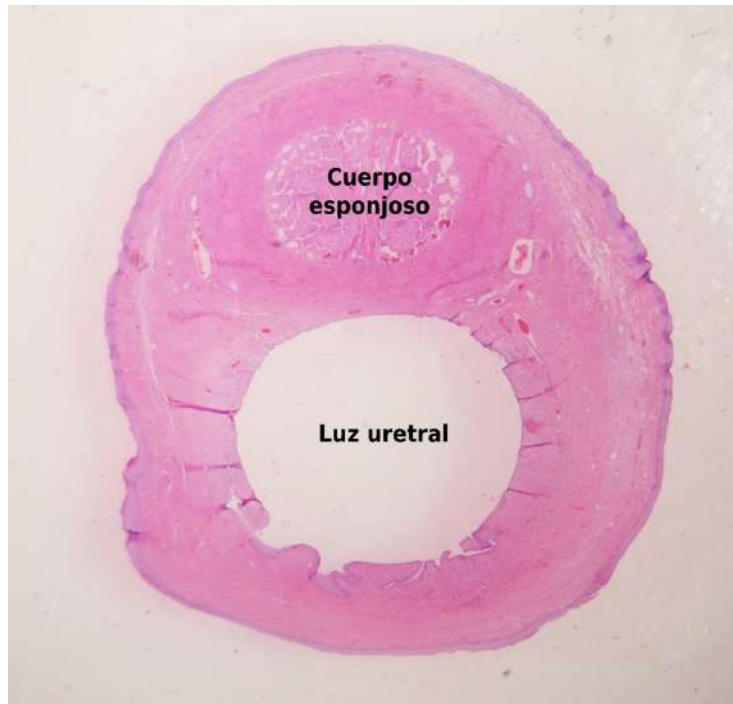


Figura 12: Sección transversal de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el cuerpo cavernoso dorsal y la luz uretral ventral (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).

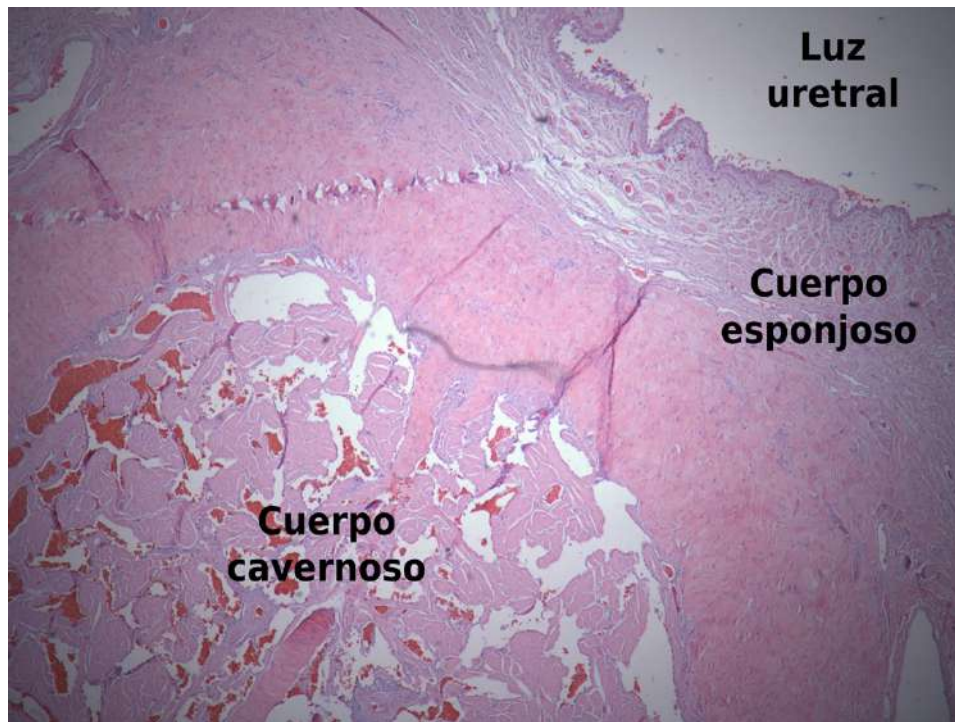


Figura 13: Imagen a mayor magnificación de la sección transversal de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el cuerpo cavernoso dorsal, la luz uretral ventral y el cuerpo esponjoso rodeando la uretra. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty).

La histología de la uretra peneana consiste en un epitelio de transición columnar estratificado que según progresa de proximal a distal se vuelve más pseudoestratificado hasta volverse escamoso no queratinizado en su porción más distal a nivel del meato en glande (Figura 14) [59].

La lámina propia de la uretra peneana está compuesta por un tejido conectivo fibroelástico laxo con abundante irrigación vascular. Alberga glándulas de Littre, cuya secreción mucosa lubrica el revestimiento epitelial de la uretra (Figura 14).

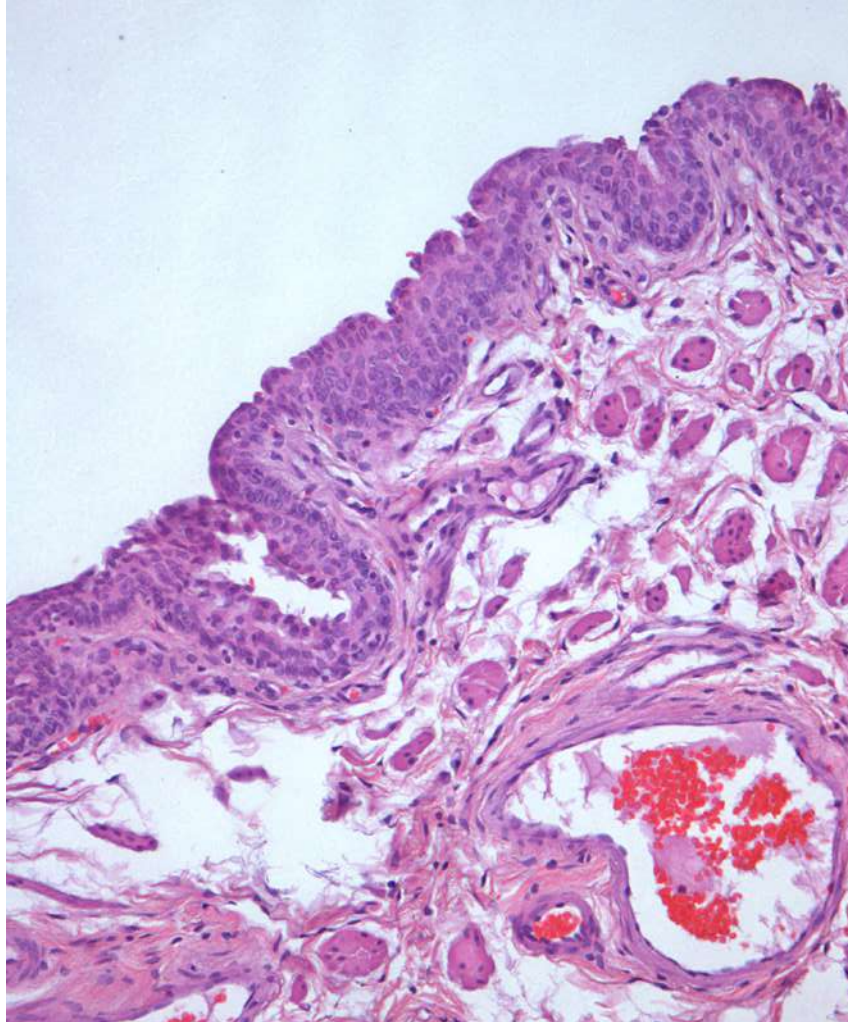


Figura 14: Imagen histológica de la uretra peneana de conejo donde se aprecia el epitelio de transición columnar estratificado, así como la lámina propia con abundante vascularización. (Fuente: Archivo personal de la Dra. María Virginia Amesty)

C. INGENIERÍA TISULAR APLICADA A LA REPARACIÓN DEL HIPOSPADIAS Y URETRAL

INTRODUCCIÓN

Como se ha expuesto previamente, la corrección del hipospadias, en especial los casos graves o en los que ha habido un fracaso de la reparación, es muy compleja y presenta complicaciones y resultados que están lejos de ser satisfactorios. La ingeniería tisular dentro del campo de la medicina regenerativa, se ha planteado como una posible fuente de tejidos sanos que permitan realizar una reconstrucción uretral en estos casos complejos en los que no se disponga de un tejido nativo adecuado para la reparación.

La ingeniería de tejidos aplicada a la reparación uretral combina principios de la bioingeniería, de las ciencias de los materiales y aspectos de la nanotecnología para crear tejidos con propiedades similares a las de la uretra nativa [10]. Los biomateriales o matrices son un elemento fundamental del desarrollo de este campo, puesto que proporcionan el soporte estructural para la migración y maduración celular para el posterior desarrollo de tejido [60]. La matriz ideal debe de ser biocompatible y biodegradable, debe poseer propiedades mecánicas similares a las del órgano nativo y permitir la manipulación quirúrgica adecuada [12]. Se han descrito múltiples tipos de matrices, las cuales se han clasificado según su naturaleza natural o sintética [61]. Las matrices naturales pueden ser derivadas de polímeros naturales tales como quitosanos, colágenos, alginatos, gelatinas, elastinas o seda; o pueden obtenerse a partir de tejido natural descelularizado, como por ejemplo la submucosa del intestino delgado (SIS: small intestine submucosa) o las matrices acelulares vesicales (BAM: bladder acellular matrix). Estas últimas tienen la ventaja de que preservan la compleja microarquitectura tisular y factores de crecimiento que favorecen la migración y crecimiento celular [11, 12]. Las matrices sintéticas están hechas de polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), entre otros [11, 12, 60, 61]. Existen además matrices híbridas que se han creado mediante una combinación de materiales sintéticos y naturales [11, 12]. En la ingeniería de tejidos aplicada a la uretra, estas matrices se han utilizado para la reparación uretral tanto de manera aislada (**matrices acelulares**) como a modo de constructos (**matrices sembradas con células**). Las células empleadas para la siembra de matrices pueden ser de diferentes tipos, desde células madre hasta células diferenciadas [11, 12, 61].

A continuación se hará una breve descripción de la literatura disponible en cuanto a la ingeniería tisular aplicada a la uretra siguiendo una clasificación basada en los estudios con matrices acelulares y los estudios con matrices sembradas con células

MATRICES ACELULARES

Las matrices acelulares promueven la migración y el crecimiento celular local proporcionando el soporte estructural y de factores de crecimiento necesarios para la regeneración celular a partir de las células nativas adyacentes a la zona donde se implantan [11,12, 61].

MATRICES ACELULARES DE POLÍMEROS NATURALES

Múltiples polímeros naturales se han empleado para la reparación del tejido uretral [62]. Uno de los más empleados ha sido el **colágeno**. Este tipo de polímero permite el moldeado para crear un tubo uretral [63]. En estudio realizado en conejos blancos machos que habían sido sometidos a una escisión uretral subtotal, se emplearon tubos de colágeno de alta densidad para reemplazar defectos uretrales de 2 cm. Como resultado se identificó la regeneración urotelial y vascular 1 mes después del procedimiento, se evidenció la formación de músculo liso a los 6 meses; y finalmente se desarrolló un tejido similar a la uretra nativa tras 6-9 meses del procedimiento. Las tasas de fístula y estenosis fueron del 20% [64]. También se han empleado matrices de **fibroína de seda** [65, 66], evidenciándose una mejor elasticidad y menor inmunogenicidad en comparación con otros polímeros como el colágeno. En un estudio en conejos se comparó el uso de matrices de fibroína de seda con matrices de SIS para reparar defectos uretrales, evidenciándose resultados similares para ambos materiales en cuanto a regeneración epitelial y del músculo liso, y un resultado superior para la seda en cuanto a respuesta inflamatoria [67].

MATRICES NATURALES DERIVADAS DE TEJIDO DESCELULARIZADO.

Las matrices de origen natural obtenidas mediante la descelularización de tejidos son estructuras que preservan la microarquitectura de los tejidos, así como los factores de crecimiento que promueven la regeneración celular [61]. Las matrices descelularizadas más comúnmente empleadas en ingeniería tisular son las matrices SIS y BAM [11, 12, 61].

El uso de la matriz SIS mediante técnica de Onlay en estudios con animales ha demostrado promover la regeneración del epitelio normal y de células de músculo liso [67-71]. Pero dicho material tiende a producir reacciones inflamatorias crónicas en comparación con otros sustitutos como matrices fibroína de seda [9]. Las uretroplastias tubulares con SIS sin células sembradas en modelos animales han dado resultados poco favorables. Algunos estudios clínicos [72-74] han demostrado que los injertos de SIS podrían utilizarse como sustitutos para la reparación de la uretra. Sin embargo, otros estudios [75-77] no avalan la aplicación del SIS para la reparación de la uretra. La discrepancia puede deberse a los diferentes enfoques quirúrgicos utilizados y diferente patología uretral entre los animales y los seres humanos. Es necesaria más evidencia científica para que la matriz SIS se pueda utilizar ampliamente en la práctica clínica. La matriz BAM parece ser un excelente biomaterial para la reparación uretral, ya que se puede obtener fácilmente y se procesa de forma segura. En la mayoría de modelos animales, los resultados fueron más favorables con el uso de matrices BAM sembradas con células (sin importar el tipo de célula empleado), en comparación con la BAM libre de células [18, 20, 77]. Sin embargo, algunos estudios también han demostrado buenos resultados con el uso de BAM libre de células [78]. El motivo de la discrepancia de estos resultados podría deberse al tamaño del injerto, que limita el crecimiento celular únicamente a la zona adyacente a la anastomosis. Algunos estudios clínicos [14, 16, 79] mostraron que el uso de matriz BAM es un método factible para la reparación de la uretra, y que es más eficaz en pacientes con un lecho uretral favorable, en comparación con aquellos con un lecho uretral poco saludable.

MATRICES SEMBRADAS CON CÉLULAS

Las matrices sembradas con células han surgido como una alternativa prometedora a las matrices acelulares. La celularización promueve la vascularización y el desarrollo de barreras uroteliales para la orina, mitigando la inflamación local y la fibrosis causada por la fuga de orina [11, 18, 19]. Tanto en estudios animales como clínicos se ha observado que las matrices sembradas con células son más adecuadas para el tratamiento de grandes defectos uretrales, así como para uretroplastias tubulares, especialmente cuando no existe un buen lecho uretral [11, 12, 19, 20, 80, 81].

FUENTES CELULARES:

Múltiples tipos celulares han sido empleados para sembrar las matrices para la reconstrucción uretral [11, 12]. Éstas se pueden clasificar en tres categorías: células diferenciadas, células madre y células progenitoras [18].

Dentro de las **células diferenciadas** se han empleado células uroteliales, células de músculo liso, células epiteliales de otro tipo (queratinocitos cutáneos o de mucosa oral), fibroblastos, entre otros [11, 12]. Las células uroteliales y células de músculo liso suelen obtenerse a partir de biopsias de vejiga [12, 23, 82]. Las células epiteliales pueden obtenerse de tejido del prepucio o de biopsias de la mucosa oral [12, 82]. Los fibroblastos se pueden obtener a partir de biopsias de piel [80]. La obtención de estas células puede requerir procedimientos como biopsias de vejiga, piel u orales, pero algunos estudios han demostrado una recolección exitosa de células uroteliales en muestras de orina evacuadas o a partir de lavados de vejiga [23-25]

Las **células madre** tienen la ventaja de poder diferenciarse en varios tipos de células necesarios para la regeneración uretral y de promover la angiogénesis [83]. Las células madre pueden ser células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células madre adultas (que incluyen células madre derivadas de la orina, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de cordón umbilical humano y células madre uretrales) [82]. Las **células madre embrionarias** tienen el mayor potencial de diferenciación, pero cuestiones éticas relacionadas con los métodos de obtención (manipulación de embriones) han limitado su uso. Las **células madre pluripotentes inducidas** son células adultas diferenciadas que se inducen para parecerse a las células madre pluripotentes [84]. Sin embargo, persisten algunas preocupaciones con respecto al riesgo de formación de teratomas con el uso de estos tipos de células [83]. Las **células madre adultas** se pueden obtener de diversas fuentes, incluida la médula ósea y el tejido adiposo, pero son multipotentes y sólo tienen la capacidad de diferenciarse en algunos tipos de células [85]. Las **células progenitoras**, como las células progenitoras endoteliales (CPE), son células primitivas que están programadas para diferenciarse en un tipo celular específico, pero no se diferencian de manera terminal [82, 85]. Estas células pueden obtenerse mediante la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas, a partir de sangre de cordón umbilical o sangre periférica de adultos [82]. Las CPE se han empleado para el desarrollo de vascularización en los tejidos de ingeniería tisular [86].

MATRICES SEMBRADAS CON CÉLULAS DIFERENCIADAS:

Las matrices sembradas con células diferenciadas han mostrado una mayor regeneración uretral en múltiples estudios. En un estudio en perros machos, defectos uretrales de 0,5cm fueron tratados con constructos uretrales tubulizados de matrices de colágeno sembradas con células epiteliales autólogas de la vejiga y del músculo liso. Los resultados se compararon con los animales control que fueron tratados con matrices aisladas. Como resultado se obtuvo una mejor regeneración tanto del músculo liso como del epitelio en el grupo de matrices sembradas con células [18]. Resultados similares se han obtenido en otros estudios de matrices de colágeno sembradas con células epiteliales de mucosa oral y células musculares [87]; y matrices de vejiga acelular tubulizadas sembradas con células epiteliales autólogas y de músculo liso [20].

En un estudio en perras, se utilizaron matrices de fibroína de seda sembradas con queratinocitos y fibroblastos orales para la reparación de defectos uretrales de 5 cm. La uretrografía retrógrada demostró que las uretras reparadas con matrices de fibroína de seda acelular desarrollaron estenosis en grados variables en los cinco animales de control, mientras que en los animales del grupo experimental las uretras reparadas presentaban buen calibre [88]. En otro estudio se emplearon matrices de membrana amniótica sembradas con células epiteliales uretrales de conejo para la reparación de defectos uretrales de 10 mm en conejos blancos machos de Nueva Zelanda. Se comparó el resultado con conejos tratados con matrices de membrana amniótica sin células. Ambos grupos presentaron regeneración uretral, pero con más complicaciones en el grupo de matrices sin células (infección y fístula), siendo la regeneración uretral, la neovascularización y la formación de músculo liso mucho mejor en el grupo de matrices sembradas con células [89].

A la luz de estos resultados podemos concluir que las células diferenciadas son una fuente de células fácilmente disponibles que pueden mejorar la regeneración uretral. Además estas células pueden obtenerse de una manera más sencilla en comparación con las células madre y progenitoras.

MATRICES SEMBRADAS CON CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS:

En un estudio experimental se emplearon matrices SIS sembradas con células madre uretrales (que son capaces de diferenciarse en células uroteliales y de músculo liso) obtenidas mediante lavados vesical [90]. Dichos constructos se utilizaron para reparar defectos uretrales generados quirúrgicamente en conejos machos de Nueva Zelanda, y los resultados se compararon con animales control tratados con SIS sin células. La uretrografía retrógrada y el estudio histológico mostró una regeneración urotelial más rápida y una mayor densidad de vasos en el grupo de matrices sembradas con células y con una ausencia de fibrosis en comparación con el otro grupo. Resultados similares se obtuvieron en un estudio en el que se utilizaron células madres de médula ósea humanas combinadas con células madre progenitoras hematopoyéticas sembradas sobre matrices sintéticas de ácido poli 1,8-octanodiol-co-cítrico para reparar defectos uretrales de 6 mm de longitud en un modelo de uretroplastia en ratas [91]. En dicho estudio se observó una reducción en los niveles de citoquinas proinflamatorias y un aumento

de la neovascularización en el grupo tratado con matrices sembradas en comparación con las matrices aisladas.

En otro estudio se crearon matrices de polímeros sintéticos sembrados con células madre derivadas de adipocitos [92]. Este constructo se incubó en un biorreactor durante 5 semanas, lo que resultó en la formación de un tubo uretral con tejido muscular, con fibras colágeno organizado y mioblastos. En otro estudio en conejos blancos machos de Nueva Zelanda en el que se emplearon matrices sintéticas sembradas con células madre derivadas de adipocitos para corregir defectos uretrales de 5 mm, se vio un resultado de una arquitectura uretral normal en los animales que recibieron la matriz sembrada, y una uretra sin capa muscular en el grupo control de matriz aislada sin células [93].

Por tanto, podemos concluir que las células madre y las células progenitoras parecen promover la regeneración y la vascularización y podrían ser clave para facilitar la angiogénesis y la prevención de la fibrosis por isquemia en la regeneración uretral.

PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA INGENIERÍA TISULAR APLICADA A LA REPARACIÓN URETRAL

La ingeniería de tejidos uretrales se ha estudiado durante muchos años con resultados cada vez más prometedores. Para la reparación de hipospadias específicamente, se requiere la creación de una uretra de buena longitud y con la capacidad de generar angiogénesis y una rápida regeneración celular. Las nuevas tecnologías podrían mejorar la generación de este tipo de construcciones. Entre los diversos avances se encuentran el uso de la nanotecnología y la bioimpresión 3D. La nanotecnología permitirá a los investigadores influir directamente en el microambiente celular e influir en procesos como la vascularización y la cicatrización de heridas. En particular, las nanofibras compuestas de polímeros sintéticos o naturales podrían ser eficaces para alterar el microambiente como módulos de administración de fármacos o sensores para la migración celular [12]. Por otro lado, la bioimpresión en 3D podría ayudar a la creación de constructos uretrales sembrados con células con una forma o diseño personalizado para el paciente, aumentando la eficiencia de generación de estas uretras de ingeniería tisular en la práctica clínica [12].

Otro aspecto fundamental para el futuro es la simplificación de las técnicas de creación de las neouretras. Cuanto más sencillo sea el proceso y más reproducible, más fácil será su difusión en la práctica clínica, puesto que podría ser llevado a acabo en cualquier laboratorio. Por tanto en la presente tesis doctoral se aboga por la creación de una neouretra con técnicas muy sencillas y con células diferenciadas y seguras, sobre una matriz que sea ampliamente usada en al clínica y que pueda obtenerse en cualquier lugar comercialmente. Sólo así podría ser viable a corto plazo su uso masivo en humanos.

D. HIPÓTESIS

1. La resección de un segmento de tejido en la cara ventral del pene desde la región subcoronal hasta la base del pene, y que incluye la mucosa uretral, tejido esponjoso, tejido subcutáneo y piel, permite la creación de un modelo experimental de hipospadias proximal en conejos gigantes de Nueva Zelanda, adecuado para el estudio de técnicas de uretroplastia.
 - 1.1. El modelo de hipospadias proximal es inofensivo para el conejo sin provocar pérdida de bienestar animal.
 - 1.2. El modelo de hipospadias proximal es estable en el tiempo y reproducible, presentando un defecto uretral crónico y de tamaño consistente en el tiempo, con poca variabilidad entre individuos.
 - 1.3. El modelo de hipospadias proximal no afecta al resto de la uretra proximal, no provoca estenosis uretrales ni re-cierre del defecto en el proceso de cicatrización.
 - 1.4. El modelo de hipospadias es adecuado para el desarrollo de técnicas de uretroplastia y permite ser reparado quirúrgicamente.

2. La siembra de células uroteliales obtenidas mediante lavado vesical sobre una matriz SIS permite la creación de tejidos uretrales similar a una uretra nativa y adecuada para realización de uretroplastias.
 - 2.1. El lavado vesical es una fuente de células uroteliales para cultivo.
 - 2.2. Las células uroteliales obtenidas de lavado vesical se adhieren a placas de cultivo y expanden adecuadamente.
 - 2.3. Las células uroteliales expandidas se siembran y adhieren adecuadamente en matrices SIS.
 - 2.4. Las células uroteliales sembradas sobre matrices SIS permiten el desarrollo de tejido uretral similar a una uretra nativa. El estudio inmunohistoquímico revela la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial.
 - 2.5. Las células uroteliales sembradas sobre matrices SIS permiten el desarrollo de tejido uretral resistente a la manipulación quirúrgica y adecuado para su utilización en uretroplastias.

3. El uso de tejido uretral de ingeniería tisular creado mediante la siembra de células uroteliales de lavado vesical sobre una matriz SIS, permite la reparación uretral en el modelo experimental de hipospadias proximal en conejos, y presenta resultados superiores a la reparación uretral únicamente con la matriz SIS sin células.
 - 3.1. La uretroplastia mediante técnica de "Onlay", bien sea usando tejido uretral de ingeniería tisular o la matriz de SIS aislada no provoca pérdida de bienestar del conejo.
 - 3.2. La uretroplastia del modelo de hipospadias en conejos con tejido uretral de ingeniería tisular a modo "Onlay" permite la reparación de la uretra, sin dehiscencia uretral, presentando el pene un aspecto macroscópico muy similar a un pene normal, sin desviaciones ni curvaturas.
 - 3.3. Es estudio radiológico de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular mediante uretrocistografía demuestra un buen calibre de la uretra y la ausencia de estenosis o fístulas.
 - 3.4. El estudio microscópico de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de

ingeniería tisular demuestra una estructura histológica similar a la uretra nativa. El estudio inmunohistoquímico revela la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial.

- 3.5. La uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular a modo de "Onlay" del modelo de hipospadias en conejos presenta resultados macroscópicos, radiológicos y microscópicos superiores al uso de de la matriz de SIS aislada sin células para la uretroplastia.

E. OBJETIVOS

1. **Crear un modelo experimental de hipospadias proximal en conejos gigantes** de Nueva Zelanda, mediante la resección de un segmento elíptico amplio de tejido en la cara ventral del pene desde la región subcoronal (preservando el glande) hasta la base del pene, incluyendo la mucosa uretral, tejido esponjoso, tejido subcutáneo y piel, para el estudio de técnicas de uretroplastia.
 - 1.1. Evaluar el impacto sobre el bienestar animal de la creación del modelo experimental de hipospadias proximal en los conejos.
 - 1.2. Evaluar la estabilidad y la reproducibilidad del modelo experimental de hipospadias proximal en conejos, mediante la determinación del tamaño del defecto uretral creado a las 5 semanas y a los 3 meses de la creación del defecto, utilizando la aplicación SketchAndCalc™. Comparación de estas determinaciones entre todos los sujetos para evaluar la variabilidad del modelo entre individuos.
 - 1.3. Estudiar radiológicamente mediante una uretrocistografía miccional el calibre de toda la uretra tras la creación del modelo, para identificar la presencia de estenosis o fístulas.
 - 1.4. Estudiar histológicamente el pene del conejo tras la reacción del modelo para evaluar la cicatrización, así como presencia de metaplasia de tejido, fibrosis, inflamación o atipia celular.
 - 1.5. Utilizar el modelo de hipospadias proximal creado para la reparación uretral con tejido uretral creado mediante ingeniería tisular.
2. **Desarrollar un tejido uretral con técnicas de ingeniería tisular** mediante la siembra de células uroteliales obtenidas de lavado vesical sobre una matriz SIS para su uso en uretroplastias.
 - 2.1. Evaluar el rendimiento del lavado vesical como fuente de células uroteliales viables para cultivo.
 - 2.2. Evaluar la adherencia de las células del lavado a las placas con Biolamina y el tiempo hasta alcanzar expansión celular.
 - 2.3. Evaluar la adherencia de las células expandidas a la matriz SIS y el tiempo de cultivo hasta la obtención de urotelio estratificado similar a la uretra nativa.
 - 2.4. Estudiar histológicamente la arquitectura del tejido uretral creado mediante ingeniería tisular y compararlo con la uretra nativa de conejo. Estudiar mediante inmunohistoquímica la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial en el tejido uretral creado.
 - 2.5. Evaluar la resistencia a la manipulación quirúrgica de los tejidos uretrales creados para su utilización en uretroplastias.
3. **Evaluar los resultados de la uretroplastia con tejido uretral creado por ingeniería tisular** mediante la siembra de células uroteliales obtenidas de lavado vesical sobre una matriz SIS, sobre el modelo experimental de hipospadias proximal creado en conejos. Comparar el resultado del uso del tejido uretral de ingeniería tisular con el uso de matriz SIS aislada en el mismo modelo.
 - 3.1. Evaluar el impacto sobre el bienestar animal de la uretroplastia mediante técnica de “Onlay”, bien sea usando tejido uretral de ingeniería tisular o la matriz de SIS aislada.

- 3.2. Evaluar los resultados macroscópicos de la uretroplastia del modelo de hipospadias en conejos con tejido uretral de ingeniería tisular a modo "Onlay", determinando la superficie de defecto uretral reparado, así como el aspecto estético, y la presencia de desviaciones o curvaturas.
- 3.3. Evaluar los resultados radiológicos de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular mediante uretrocistografía miccional, documentando el calibre de la uretra y la presencia de estenosis o fístulas.
- 3.4. Evaluar los resultados microscópicos de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular, determinando el grado de estratificación epitelial, la vascularización, así como la presencia de metaplasia, fibrosis, inflamación o atipia celular en la zona reparada y adyacente. Evaluar mediante inmunohistoquímica la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial en las zonas de reparación uretral.
- 3.5. Comparar resultados macroscópicos, radiológicos y microscópicos del uso de tejido uretral de ingeniería tisular con el uso de de la matriz de SIS aislada sin células para la reparación uretral en el modelo de hipospadias.

MATERIALES Y MÉTODOS

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz (CEBA-08-2016), así como el Comité de Ética/Subcomité de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid (CEI72-1291-A161) y la Conserjería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX-186/16). El proyecto cumple con los requisitos en materia de protección animal conforme a lo establecido en el RD 53/2013, tiene una clasificación de proyecto tipo II y una severidad moderada y ha sido evaluado favorablemente por los órganos habilitados. La investigadora principal y doctoranda de la presente tesis está acreditada funciones B, C y D para la experimentación animal.

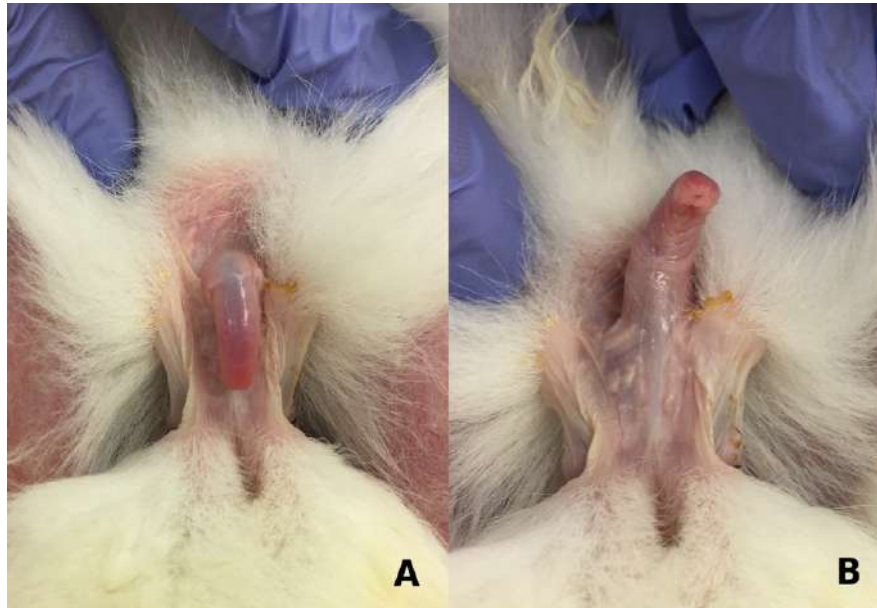
CREACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE DEFECTO URETRAL EN CONEJOS

SUJETOS

Veintidós conejos gigantes de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) adultos de 16 semanas de edad y de mediana de peso de 4.5 (4-5) kg, fueron intervenidos para crear un defecto uretral crónico simulando los grandes defectos uretrales de hipospadias proximales. El conejo gigante de Nueva Zelanda adulto es un animal que presenta unos genitales favorables para realizar un modelo de hipospadias, debido a sus similitudes anatómicas con el pene humano. Presenta cuerpos cavernosos dorsales expuestos con su correspondiente túnica albugínea, un cuerpo esponjoso ventral que rodea la uretra y un glande. Además carece de hueso peneano presente en otras especies de animales de experimentación. Presenta un calibre uretral similar al de un niño de 1-2 años de vida, de aproximadamente calibre 8 French (Fr), y por tanto puede ser operado con el mismo material quirúrgico que en pacientes humanos y sin necesidad de magnificación con gafas mayor a 2.5-3 X (Figura 15).

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

La intervención se realizó bajo anestesia general. Se realizó una inducción anestésica con Ketamina (25-30 mg/kg) y Xilacina (5-8 mg/kg) y mantenimiento con anestesia inhalatoria con Isoflurano (1-2%) y analgesia con Metacam (1 mg/kg). Se colocó una mascarilla laríngea específica de conejos para asegurar la vía aérea y se canalizó una vía venosa periférica. Toda la intervención se realizó bajo monitorización ventilatoria y cardiovascular, con pulsioximetría, medición de la tensión arterial y frecuencia cardíaca, electrocardiograma y capnografía. (Figura 16). Se administró antibiótico profiláctico preoperatorio con Rofloxacino (10 mg/kg).



*Figura 15: Pene del conejo gigante de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). (A) Cara dorsal del pene. (B) Cara ventral del pene.*



Figura 16: Procedimiento anestésico para llevar a cabo el modelo de hipospadias.

Se colocó el animal en decúbito supino y se realizó un sondaje vesical con una sonda de Foley 8 Fr. Para crear el defecto uretral se reseco un segmento elíptico de aproximadamente 70 mm² (18x5 mm de diámetro) en la uretra ventral, incluyendo la mucosa uretral, tejido esponjoso, tejido subcutáneo y piel, justo proximal al glande, preservando intacto este último, llegando el defecto a la base del pene. El glande se dejó intacto en el modelo para eludir la colocación de un catéter uretral que evite el edema y riesgo de retención urinaria aguda tras la reparación uretral. Los bordes del defecto fueron unidos con una sutura quirúrgica absorbible sintética monofilamento de Poliglecaprona 25 (Monocryl® 6-0) uniendo la piel con la mucosa uretral para crear un defecto elíptico estable (Figura 17). Al final de la intervención se retiró la sonda uretral. Tras la intervención se administró analgesia postoperatoria con Metacam durante 48 horas.

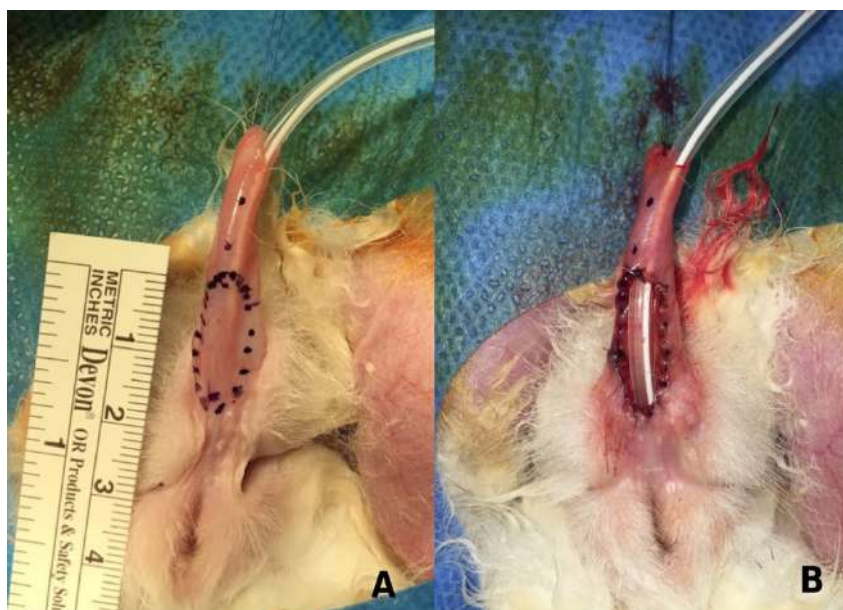


Figura 17: Creación del modelo de hipospadias. (A) Pene con el dibujo del área de resección uretral para crear el defecto hipospádico. (B) Resultado final de la creación del defecto.

EVALUACIÓN DEL MODELO

El bienestar de los sujetos se evaluó con un protocolo específico de supervisión animal, que fue aplicado las primeras dos semanas postoperatorias cada 24 horas. Los parámetros evaluados fueron el peso, las secreciones, el aspecto del pelaje, la existencia de automutilación, el aspecto de la herida quirúrgica, la presencia de chillidos y la presencia de posturas de ocultación. Se utilizó una escala de 0-12 puntos, donde 0 puntos corresponde a un estado normal y 12 puntos es la puntuación máxima permitida, siendo criterio de punto final que obliga al sacrificio anticipado del animal de acuerdo con los principios de éticos de experimentación animal (Tabla 1). El valor considerado para cada conejo fue la puntuación máxima obtenida durante la aplicación del protocolo de supervisión.

Parámetros	Frecuencia	Puntuación
Peso	72h	Perdidas del 10%=1; 20%=2; 30%=3
Secreciones	24h	0-1-2-3
Pelaje	24h	0-1-2-3
Automutilación	24h	12 puntos
Herida quirúrgica	24h	Bien 0; inflamada 1; supuración 2
Chillidos	24h	0-1-2
Postura de ocultación	24h	0-1-2

Tabla 1: Escala de bienestar animal aplicada para la supervisión de los animales. El rango de puntuación es 0-12 puntos, donde 0 puntos corresponde a un estado normal y 12 puntos es la puntuación máxima permitida, siendo criterio de punto final que obliga al sacrificio anticipado del animal de acuerdo con los principios de éticos de experimentación animal. El valor considerado para cada conejo fue la puntuación máxima obtenida durante la aplicación del protocolo de supervisión (14 días).

Después de 5-6 semanas, se estudió la reproducibilidad y estabilidad del modelo en el tiempo, mediante análisis macroscópico del pene bajo anestesia general, determinando la presencia de inflamación, infección y midiendo el área del defecto uretral. Esta área se calculó con precisión mediante la aplicación SketchAndCalc™, que cuantifica la superficie exacta del defecto mediante el uso de una fotografía del pene utilizando una escala de referencia, basada en la dimensión de la sonda uretral (Figura 18). Se realizó una comparación de la medida del defecto calculado en el momento de la creación y pasadas las 5-6 semanas.

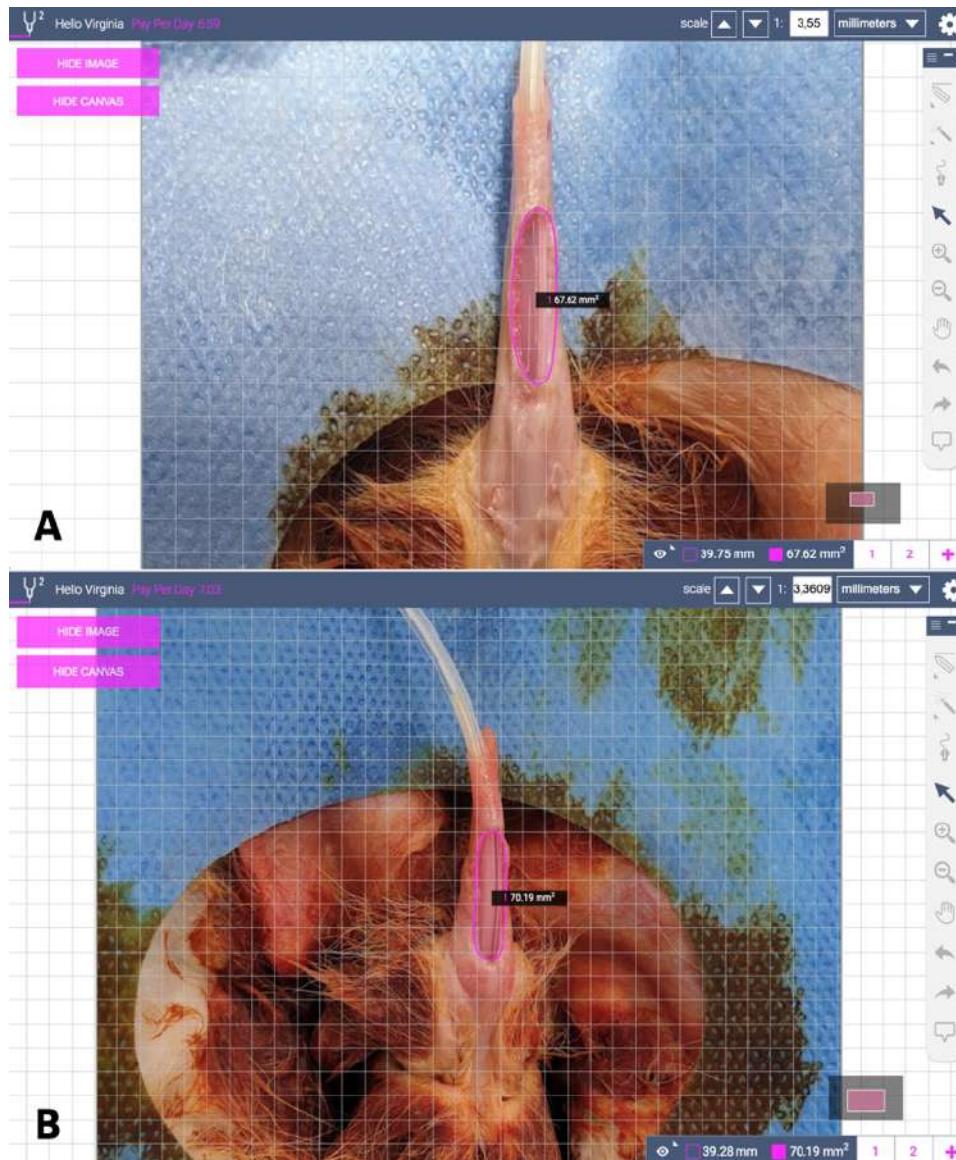


Figura 18: Ejemplos de medida del defecto uretral mediante la aplicación SketchAndCalc™, que cuantifica la superficie exacta del defecto mediante el uso de una fotografía del pene utilizando una escala de referencia, basada en la dimensión de la sonda uretral que es una medida fija. (A) Medida del conejo 21 a las 5 semanas de la creación del defecto, 67,62mm². (B) Medida del conejo 22 a las 5 semanas de la creación del defecto, 70,19mm².

En 2 de los conejos, el modelo se dejó intacto para evaluar la estabilidad a largo plazo después de 3 meses. En este grupo, se volvió a medir el área del defecto con la aplicación, y se realizó citouretrografía miccional y análisis histológico.

ESTUDIO PILOTO PARA EL DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CULTIVO CELULAR A PARTIR DE CÉLULAS DE LAVADO VESICAL

Para desarrollar la técnica de cultivo de células uroteliales del presente estudio y la puesta a punto de todos los procesos, se realizó inicialmente un estudio piloto con células obtenidas de 2 conejos no incluidos en el estudio final. Dichos conejos fueron empleados únicamente para obtener células de lavado vesical bajo anestesia general. En ellos no se realizó el modelo de hipospadias ni la uretroplastia reconstructiva.

En éstos conejos los lavados vesicales se realizaron en múltiples ocasiones para, mediante ensayo y error, determinar las mejores técnicas de lavado vesical, procesamiento de las células, técnicas de cultivo, medios de cultivo y suplementos necesarios. Finalmente se depuró la técnica de creación de cultivo uretral del presente estudio que se expone a continuación.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS UROTELIALES MEDIANTE LA TÉCNICA DE LAVADO VESICAL

Los tejidos uretrales se crearon con células uroteliales autólogas, obtenidas con un método no invasivo basado en técnicas descritas previamente [21-23] con algunas modificaciones. Bajo anestesia general y en condiciones de esterilidad, se realizó un sondaje vesical con una sonda Foley 8 Fr y extracción de toda la orina del conejo. Posteriormente se realizaron sucesivos lavados de la vejiga introduciendo 50 ml de solución salina a 36°C y extrayendo el mismo volumen hasta recolectar un volumen total de 300ml (6-8 lavados) (Figura 19). Con esta técnica de lavado se obtuvieron por descamación células uroteliales con potencial de reproducción mezcladas con otros múltiples tipos de células.



Figura 19: Técnica de lavado vesical.

PROCESAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS UROTELIALES

El líquido de lavado vesical obtenido se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se lavó usando medio de cultivo Dubelcco Eagle modificado (DMEM), y se re-centrifugó durante 5 minutos más obteniéndose un pélet rico en células. Dicho sedimento se suspendió en 3ml de medio de cultivo CnT-Prime® (Cell-n-Tech®) específico para cultivo de epitelios, suplementado con suero bovino fetal (FBS ThermoFisher®) y antibióticos (penicilina-estreptomicina 5000UI/5000µg Lonza™-BioWhittaker™). La suspensión celular final se cultivó en un pocillo de 10cm² de una placa de cultivo “6-well plate” recubierto con una mezcla de laminina recombinante humana (Biolaminin 521LN 5µg/ml y Biolaminina 511LN 5µg/ml, Biolamina®). Las células se cultivaron en un incubador de CO₂ hasta alcanzar la subconfluencia, (70-80% de ocupación del pocillo), momento en el que se llevó a cabo el levantamiento de las células usando la enzima acutasa (CnT-Accutase-100, Cell-n-Tech®).

SIEMBRA DE LAS CÉLULAS UROTELIALES EN LA MATRIZ Y CREACIÓN DEL EPITELIO ESTRATIFICADO

Las suspensión de células obtenida tras usar la enzima acutasa se sembró en una matriz de submucosa del intestino delgado porcino descelularizado o matriz SIS (Biodesign® 1-layer tissue graft, Cook Biotech®) con medio de cultivo CnT-Prime® sin FBS durante 24 horas para conseguir la adhesión de las células a la matriz. Posteriormente la matriz con las células adheridas se cultivó en interfase aire-líquido utilizando soportes permeables “transwell” (Falcon® Permeable Supports for 6-well Plate with 1.0 µm Transparent PET Membrane) durante 3 semanas, para conseguir la estratificación del epitelio.

Los tejidos creados tenían una forma rectangular de aproximadamente 30 x 7 mm, según el tamaño de la matriz SIS utilizada. Se usó una parte del tejido creado (10 x 7 mm) para histología e inmunohistoquímica, y el segmento restante (20 x 7 mm) se usó para realizar uretroplastia reconstructiva en el modelo de hipospadias.

EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR

Se evaluó el rendimiento del lavado vesical en los conejos para obtener de células viables para cultivo, considerándose eficaz el lavado vesical si aparecían colonias de células uroteliales en un plazo de 14 días desde su obtención. Se cuantificó el número de células obtenidas por lavado. Se identificaron las características bioquímicas del líquido de lavado mediante el uso de una tira reactiva de orina, determinándose pH, proteínas, glucosa, cetonas, hemoglobina, bilirrubina, urobilinógeno, nitritos, leucocitos, densidad del líquido. Se correlacionó las características del líquido de lavado (número de células y características bioquímicas) y el tiempo de aparición de las primeras colonias de células uroteliales.

Asimismo, se evaluó la adherencia de las células del lavado a las placas con Biolamina y el tiempo hasta alcanzar subconfluencia celular. Se cuantificó el número de células obtenidas en el cultivo

de cada conejo tras el levantamiento con acutasa. Se evaluó la adherencia de las células expandidas a la matriz SIS y el tiempo de cultivo hasta la obtención de urotelio estratificado similar a la uretra nativa.

CARACTERIZACIÓN CELULAR Y ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los tejidos uretrales creados fueron fijados en formol, deshidratados en series ascendentes de etanol y embebidos en parafina. Se realizaron secciones transversales de 7µm. Las células uroteliales se caracterizaron mediante la reacción del anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratina 7 (CK7 Clon OV-TL 12/30; Dako Omnis®). El inmunomarcaje se realizó utilizando el sistema de detección de peroxidasa de rábano picante (HRP), visualizado con cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (EnVision FLEX +, anticuerpo secundario K8002 de ratón pH alto; Dako Omnis®), y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Para el análisis histológico se utilizó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Se evaluó la presencia de células uroteliales y la estratificación epitelial, así como la presencia de metaplasia o atipia celular. En total, se analizaron dos portaobjetos de H&E y dos de inmunohistoquímica por cada tejido uretral de cada conejo.

REPARACIÓN DEL DEFECTO URETRAL Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL TEJIDO URETRAL CREADO

Para evaluar los tejidos uretrales creados, los 22 conejos se dividieron en 3 grupos (Tabla 2): Grupo-A o grupo control (2 conejos) en los que no se realizó uretroplastia reconstructiva y se dejó intacto el modelo de hipospadias. Grupo-B o grupo de uretroplastia con matriz SIS (10 conejos) en el que se realizó una uretroplastia reconstructiva con matriz de submucosa de intestino delgado porcino descelularizada (Biodesign® 1-layer tissue graft, Cook Biotech®). Grupo-C o grupo de uretroplastia con tejido uretral (10 conejos), en el que se realizó una uretroplastia reconstructiva con el tejido uretral creado mediante ingeniería tisular.

GRUPO	DESCRIPCIÓN	ANIMALES (n)
(A) Control	No realización de uretroplastia reconstructiva Modelo de hipospadias intacto	2
(B) Uretroplastia con matriz SIS	Uretroplastia reconstructiva con matriz de submucosa de intestino delgado porcino descelularizada	10
(C) Uretroplastia con tejido uretral creado mediante ingeniería tisular	Uretroplastia reconstructiva con el tejido uretral creado mediante ingeniería tisular, sembrando la matriz SIS con células uroteliales autólogas obtenidas de lavado vesical	10

Tabla 2: Grupos estudio para evaluación *in vivo* de los tejidos uretrales creados por ingeniería tisular.

PROCEDIMIENTO DE URETROPLASTIA

La uretroplastia se realizó aproximadamente 5-6 semanas después de la creación del modelo para asegurar una buena cicatrización y permitir la realización del cultivo celular. Se administró antibiótico profiláctico con Ceftriaxona (20 mg/kg) antes del procedimiento. Durante la reconstrucción, se colocó un catéter uretral 8 Fr en la vejiga y se movilizó la piel del pene. El material elegido para la uretroplastia según el grupo de tratamiento (matriz SIS sola o tejido uretral de ingeniería tisular) tenía unas dimensiones de aproximadamente 20 mm x 7 mm, correspondientes aproximadamente al tamaño del defecto uretral. El material se implantó en modo "Onlay", colocándolo en el lado ventral del defecto de hipospadias para completar el cilindro uretral. La fijación del material se realizó con una sutura de monofilamento absorbible Poliglecaprona 25 (Monocryl® 6-0) (Figura 20). La uretroplastia se cubrió con la piel del pene adyacente, suturada en la línea media ventral, evitando el solapamiento de las suturas. El catéter uretral se retiró al final del procedimiento, debido a la tendencia de los conejos a morder y extraer los catéteres. Se administró analgesia intramuscular con Meloxicam (1 mg/kg) cada 24 horas durante 2 días. La escala de bienestar específica para supervisar a los conejos se aplicó durante el postoperatorio.

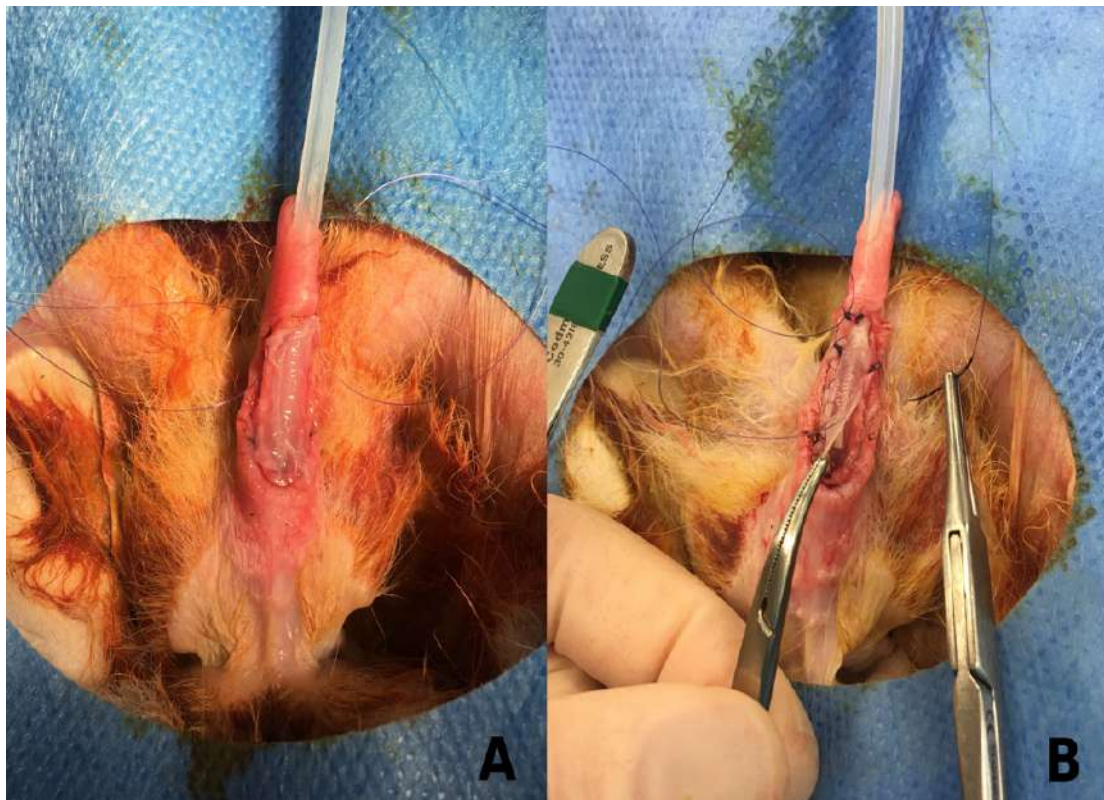


Figura 20: Técnica de uretroplastia: colocación de material elegido para la uretroplastia a modo "Onlay" para cubrir el defecto uretral. (A) Uretroplastia con tejido uretral de ingeniería tisular. (B) Uretroplastia con matriz SIS.

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DEL TEJIDO URETRAL CREADO A LA MANIPULACIÓN QUIRÚRGICA

La resistencia a la manipulación quirúrgica tanto del la matriz de SIS como del tejido uretral creado fue estudiada y comparada por parte del cirujano que llevó a cabo la uretroplastia. Se evaluó la aparición de roturas o deformaciones en ambos materiales durante el procedimiento al realizar la sutura y la tracción con pinzas.

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y RADIOLÓGICA DE LA URETROPLASTIA

Los resultados de la uretroplastia se evaluaron 4 semanas después de la cirugía reconstructiva. Los conejos se examinaron bajo anestesia general. El examen macroscópico del pene fue realizado por un evaluador externo ciego para determinar si se logró la corrección del defecto uretral, evaluar la existencia de curvaturas del pene y evaluar la apariencia estética, utilizando una escala estética subjetiva de 0-10 puntos. (siendo 0 la peor apariencia, 10 la mejor apariencia). Se tomaron fotografías para medir el área del defecto uretral en casos de fístula uretral o dehiscencia, y esta área se calculó mediante la aplicación SketchAndCalc™. También se realizó una cistouretrografía miccional llenando la vejiga con contraste yodado, para determinar y documentar el calibre de la uretra y la presencia de estenosis o fístulas. Después del llenado vesical completo, los animales presentaron erección penéana lo que permitió confirmar o descartar la presencia de curvatura penéana.

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Al finalizar la evaluación macroscópica y radiológica de los animales, bajo anestesia general, se procedió a la administración de una solución de cloruro potásico intravenoso para llevar a cabo el sacrificio de los animales por parada cardiorrespiratoria, conforme con la normativa de ética y bienestar animal del RD 53/2013.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA URETROPLASTIA

Tras el sacrificio de los animales, se realizó un estudio histológico e inmunohistoquímico de los penes de los animales. Éstos se fijaron en formalina tamponada, se deshidrataron en series ascendentes de etanol y se embebieron en parafina. Se procesaron secciones axiales de los penes de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se evaluó la presencia de células uroteliales y la estratificación epitelial, así como la existencia de fibrosis, metaplasia o atipia. Las células uroteliales se caracterizaron mediante la reacción del anticuerpo monoclonal de ratón anticitoqueratina 7 (CK7 Clon OV-TL 12/30; Dako Omnis®). El inmunomarcaje se realizó utilizando el sistema de detección de peroxidasa de rábano picante (HRP), visualizado con 3,3'-diaminobencidina (DAB) Cromógeno (ratón EnVision FLEX +, anticuerpo secundario K8002 de pH alto; Dako Omnis®), y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. En total, se analizaron dos portaobjetos de H&E y dos de inmunihistoquímica por cada pene.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recogidos se analizaron utilizando SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los datos categóricos se compararon mediante la prueba de Chi Cuadrado. Los datos continuos se presentaron mediante la mediana y el rango y se compararon mediante la prueba de U de Mann Whitney. Los datos continuos distribuidos normalmente se presentaron como media y desviación estándar y se analizaron con la prueba T de Student o Análisis de la Varianza. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $p < 0,05$. Para analizar la correlación entre dos variables se utilizó el coeficiente de correlación Rho de Spearman.

RESULTADOS

MODELO EXPERIMENTAL DE DEFECTO URETRAL

BIENESTAR ANIMAL

Todos los sujetos sobrevivieron a la intervención, presentando mínimas molestias en los primeros 2-3 días postoperatorios, controladas con la analgesia intramuscular. No se observó cambio de peso en ninguno de los animales. Todos presentaron hematuria leve que se limitó en las primeras horas postoperatorias. En la escala de bienestar el total de los conejos presentó una puntuación mediana de 1 (0-2) punto (Tabla 3).

Sujeto	Puntuación en la escala de bienestar
conejo 1	0
conejo 2	1
conejo 3	0
conejo 4	0
conejo 5	1
conejo 6	1
conejo 7	2
conejo 8	1
conejo 9	1
conejo 10	0
conejo 11	1
conejo 12	1
conejo 13	0
conejo 14	1
conejo 15	2
conejo 16	0
conejo 17	0
conejo 18	1
conejo 19	1
conejo 20	1
conejo 21	0
conejo 22	1
Mediana	1
Rango	0-2

Tabla 3: Puntuación obtenida para cada conejo en la escala de bienestar durante las dos semanas postoperatorias en la que se aplicó del protocolo de supervisión. El valor de puntuación corresponde al valor máximo obtenido para cada conejo durante todo el periodo de supervisión.

RESULTADOS MACROSCÓPICOS

En todos los conejos se mantuvo el defecto uretral creado sin presentar ningún re-cierre. No hubo signos de inflamación o infección en el área quirúrgica, ni lesiones en los tejidos adyacentes (Figura 21).



Figura 21: Modelo de defecto uretral del conejo 1. (A) Pene de conejo con el dibujo del área de resección uretral para crear el defecto. (B) Defecto uretral recién creado. (C) Defecto uretral crónico grande después de 3 meses de su creación. (D) Área calculada del defecto uretral final (mediante la aplicación SketchAndCalcTM).

El área media del defecto en el momento de su creación calculada por la aplicación SketchAndCalcTM fue de $70,63 \pm 1,29 \text{ mm}^2$, y a las 5 semanas fue de $70,27 \pm 2,50 \text{ mm}^2$, no siendo esta variación estadísticamente significativa ($p=0,35$) (Tabla 4).

Sujeto	Área de defecto uretral inicial	Área de defecto uretral a las 5-6 semanas	Área de defecto uretral a los 3 meses
conejo 1	70,69	70,65	70,66
conejo 2	70,69	72,25	72,25
conejo 3	71	72,67	-
conejo 4	71,2	71,81	-
conejo 5	70,2	71,91	-
conejo 6	70,5	67,75	-
conejo 7	72,9	74,07	-
conejo 8	70,3	67,09	-
conejo 9	71,6	70,99	-
conejo 10	72,8	72,97	-
conejo 11	70,5	68,19	-
conejo 12	71	69,05	-
conejo 13	69,2	67,13	-
conejo 14	70,6	72,26	-
conejo 15	69,7	68,69	-
conejo 16	70,2	69,36	-
conejo 17	72,5	74,54	-
conejo 18	72,2	71,90	-
conejo 19	68,1	65,10	-
conejo 20	70,1	69,69	-

conejo 21	69,7	67,62	-
conejo 22	68,1	70,19	-
Media	70,63	70,27	71,46
DE	1,29	2,50	1,12
Mediana	70,55	70,42	71,46
Rango	68,1 - 72,9	65,10 - 74,54	70,66 - 72,25
T Student (área inicial- área a las 5-6 semanas)			$p = 0,35$
U Mann Whitney (área inicial- área a los 3 meses)			$p = 0,35$

Tabla 4: Área del defecto uretral para cada conejo en el momento de su creación, a las 5-6 semanas y a los 3 meses.

En los 2 conejos del grupo A, en los que se dejó intacto el modelo, no hubo cambios en el defecto creado, ni en su tamaño ($p = 0,35$), ni en las características de los tejidos a los 3 meses de la cirugía (Tabla 4).

RESULTADOS RADIOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS

En los 2 conejos del grupo A, en la cistouretrografía realizada tras 3 meses de realización del defecto uretral se identificó una gran fuga urinaria en el sitio del defecto, con uretra posterior normal y sin signos de estenosis (Figura 22).

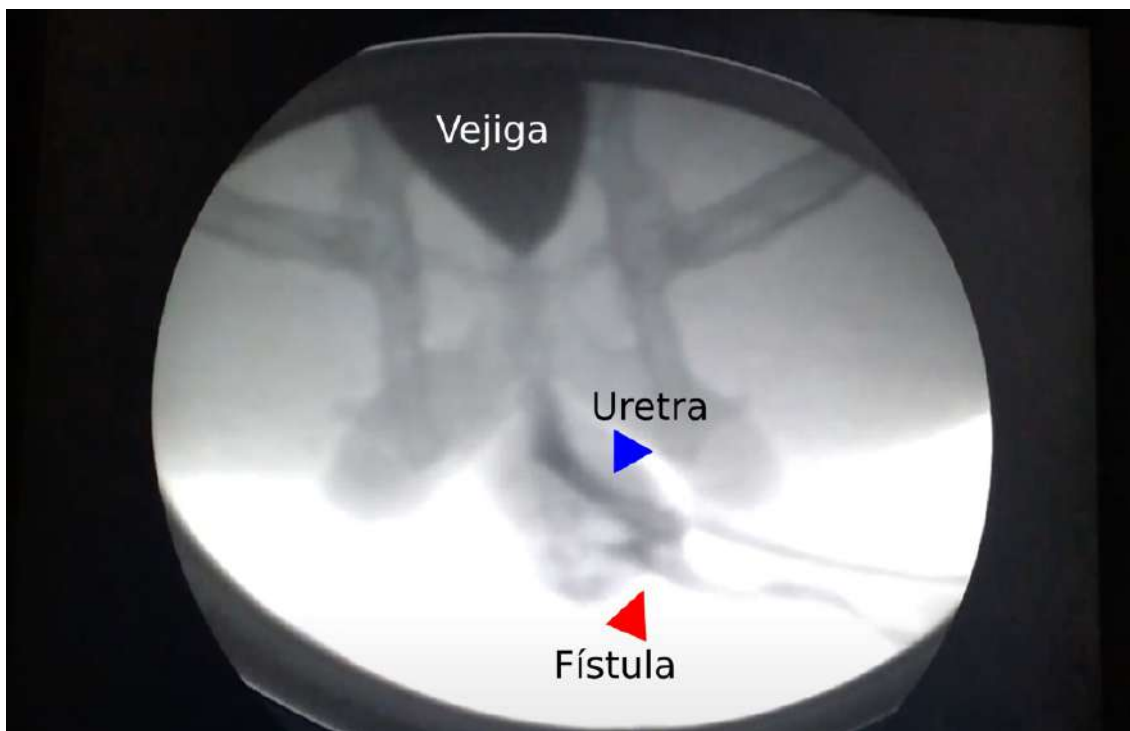


Figura 22: Cistouretrografía miccional a los 3 meses de creación del modelo de defecto uretral del conejo 1 donde se aprecia gran fuga urinaria en la zona del defecto (flecha roja).

En el estudio histológico con H&E de los conejos del grupo A se encontró un amplio defecto uretral en la cara ventral del pene, con un epitelio estratificado queratinizado en los bordes del defecto y un epitelio tipo urotelial en la cara dorsal y caras laterales de la uretra, con una

transición al epitelio queratinizado junto a los bordes del defecto (Figura 23). Adyacente a la uretra se identificó tejido esponjoso sano. No se observaron signos de inflamación. La vascularización de los bordes del defecto fue adecuada y no hubo signos de fibrosis.

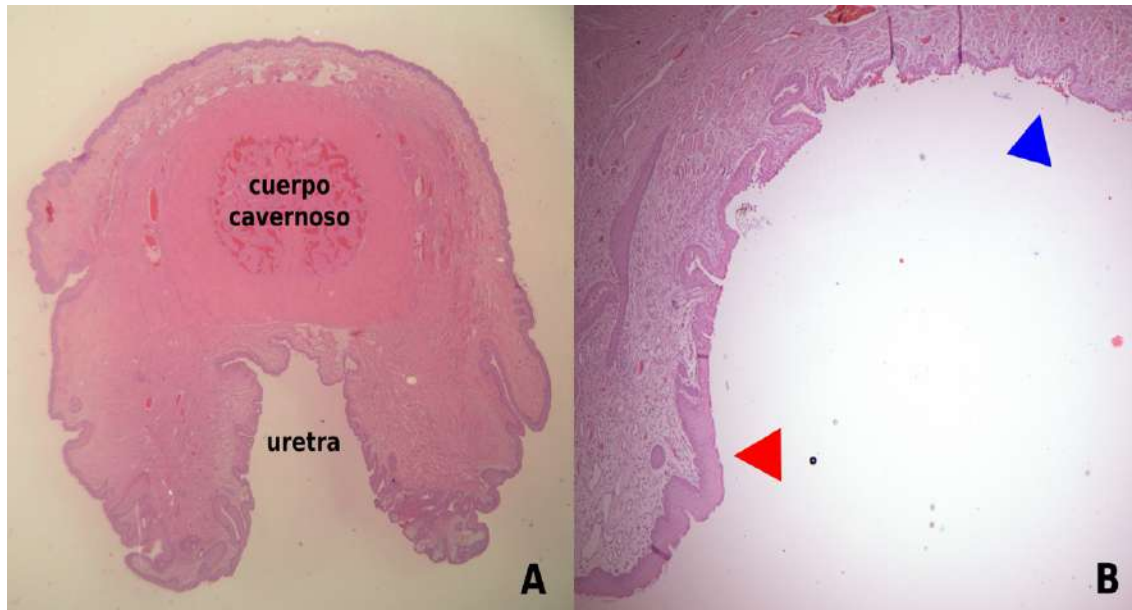


Figura 23: Imagen histológica en H&E del pene del conejo 1 con el modelo de hipospadias. (A) Imagen de un corte axial completo del pene, donde se aprecia el cuerpo cavernoso en la zona dorsal del pene (arriba) y la uretra en la zona ventral (abajo) que presenta una solución de continuidad en su cara más ventral en la zona del defecto uretral creado. (B) Imagen magnificada (objetivo 40X) donde se identifica el epitelio estratificado queratinizado en los bordes del defecto (flecha roja) y un epitelio tipo urotelial en la cara lateral y dorsal de la uretra (flecha azul).

TEJIDO URETRAL CREADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

RESULTADOS DEL ESTUDIO PILOTO PARA EL DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CULTIVO CELULAR A PARTIR DE CÉLULAS DE LAVADO VESICAL

Los hallazgos más relevantes del estudio piloto para desarrollar la técnica de cultivo fueron los siguientes:

- El lavado vesical debía realizarse después de vaciar toda la orina del conejo de la vejiga puesto que los sedimentos presentes en la orina de conejo interferían con la aparición de las primeras colonias.
- El volumen óptimo de lavado vesical fue de 300ml. Con un volumen inferior la eficacia del lavado era menor y con un volumen mayor no se conseguían más colonias de células uroteliales viables.
- El cultivo inicial del lavado vesical precisó el recubrimiento de las placas de cultivo con algún tipo de molécula de la membrana extracelular para conseguir la adhesión celular. Se usó colágeno, laminina y células alimentadoras de fibroblastos. Sin recubrimiento de la placa fue posible el establecimiento de colonias pero eran muy escasas y no alcanzaban un número crítico de células para la supervivencia a largo plazo. El

recubrimiento más efectivo en conseguir adherencia celular fue la combinación de 2 lamininas recombinantes humanas (Biolaminin 521LN 5µg/ml y Biolaminina 511LN 5µg/ml). Además este recubrimiento presentaba la ventaja de poder ser usado en la práctica clínica por ser un producto seguro para el uso en humanos.

- El medio de cultivo utilizado CnT-Prime® (Cell-n-Tech®) específico para cultivo de epitelios precisó suplementación con suero bovino fetal (FBS ThermoFisher®) y antibióticos (penicilina-estreptomocina 5000UI/5000µg LonzaTM-BioWhittakerTM) para el establecimiento de las primeras colonias. Sin la presencia de suero las células uroteliales crecían muy lentamente y la supervivencia inicial era peor. Sin los antibióticos el riesgo de contaminación de los cultivos era muy alto.
- La adherencia de las células uroteliales a la matriz de SIS fue muy eficaz tras el primer pase de células cultivadas.
- Para conseguir la estratificación del cultivo urotelial fue necesario cultivar en interfase aire-líquido utilizando soportes permeables “transwell” (Falcon® Permeable Supports for 6-well Plate with 1.0 µm Transparent PET Membrane). No fue necesario usar medios de cultivo especiales de epitelio para estratificación (CnT-Prime® 2D o CnT-Prime® 3D), puesto que con el medio normal y la interfase aire-líquido se conseguía el mismo nivel de estratificación que con dichos medios.
- Para obtener una estratificación de al menos 3-5 capas fue necesario realizar los cultivos durante 3 semanas.

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO CELULAR

En todos los casos del presente estudio se establecieron cultivos uroteliales mediante el método del lavado vesical. En 7 de los 22 conejos (31,82%) fue necesario repetir el lavado una vez, ya que no se formaron colonias en los primeros 14 días. El promedio de lavados fue de 1,32 (+/- 0,48) por conejo. En ningún caso fue necesario más de dos lavados. La suspensión celular final del lavado vesical contenía una mezcla de diferentes tipos de células (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, células uroteliales, fibroblastos, entre otros). El número de células obtenidas fue muy variable con una media de 23.776.227+/-21.337.791 célula por lavado. Dicha variabilidad dependía del la hematuria que presentaba el líquido del lavado, determinada mediante el grado de hematuria presente en tira reactiva de orina (medida como -, +, ++, +++; registrado en escala nominal de 0 a 3), con una correlación de mayor número de células a mayor hematuria del lavado (rho de Spearman = 0,95). No hubo correlación entre el número de células obtenidas del lavado y el tiempo de aparición de las primeras colonias (rho de Spearman = -0,02) (Tabla 5). Tampoco hubo correlación entre las otras características del líquido (pH, proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, nitritos, leucocitos, densidad del líquido) y el número de células obtenidas o el tiempo de aparición de colonias.

Sujeto	Nº lavados	Hematuria	Nº células /lavado	Días 1º colonia
conejo 1	1	1	8500000	4
conejo 2	1	2	15900000	9
conejo 3	2	3	24876000	8
conejo 4	1	0	7570000	11

conejo 5	1	3	32780000	9
conejo 6	2	1	8678000	6
conejo 7	1	0	5976000	11
conejo 8	1	2	11768000	10
conejo 9	2	3	45670000	6
conejo 10	1	1	8670000	11
conejo 11	2	3	61360000	8
conejo 12	2	1	9410000	9
conejo 13	1	0	6660000	7
conejo 14	1	3	64670000	9
conejo 15	1	3	56789000	7
conejo 16	1	2	20500000	7
conejo 17	1	0	7800000	14
conejo 18	1	0	3500000	7
conejo 19	1	3	49000000	11
conejo 20	2	2	12500000	7
conejo 21	2	3	56000000	7
conejo 22	1	0	4500000	5
Media	1,32	1,64	23776227	8,32
DE	0,48	1,26	21337791	2,36
Mediana	1	2	12134000	8
Rango	1-2	0-3	3500000-64670000	4 -14
Coeficiente de correlación hematuria/nº células (rho)				0,95
Coeficiente de correlación nº células/días 1º colonia (rho)				-0,02

Tabla 5: Evaluación de la técnica de lavado vesical: número de lavados por conejo, hematuria presente en el líquido de lavado determinada por tira reactiva de orina, número de células obtenidas por lavado, número de días hasta la aparición de las primeras colonias celulares en el cultivo. (Para los casos con 2 lavados por conejo se tomo en cuenta 2º lavado que dio a lugar colonias para el resto de valores).

EVALUACIÓN DEL PROCESAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS UROTELIALES

En el 100% de los casos se consiguió adherencia celular a las placas de cultivo, utilizándose la mezcla de Biolaminin 521LN 5µg/ml ml (0,45 µg/cm²) y Biolaminina 511LN 5µg/ml (0,45 µg/cm²) y posteriormente se obtuvo un cultivo de células uroteliales en subconfluencia (70-80% de ocupación del pocillo) (Figura 24).

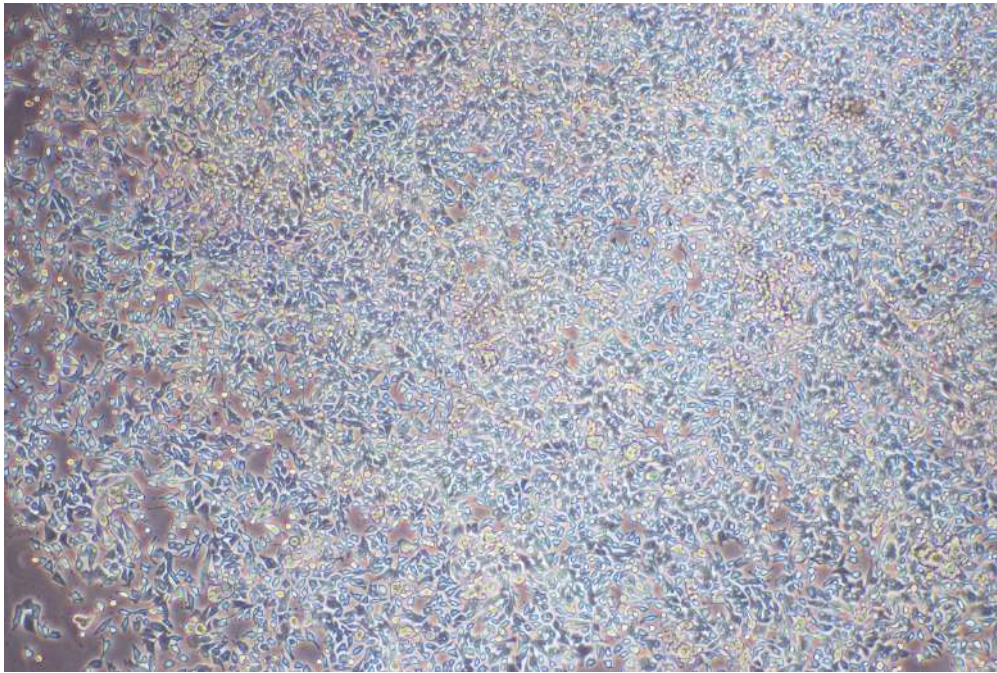


Figura 24: Imagen microscópica del cultivo de células uroteliales sobre la placa de cultivo recubierta de Biolamina en estado de subconfluencia celular (70-80% de ocupación del pocillo).

La mediana de días de cultivo hasta la obtención de subconfluencia en la placa fue de 15 (11-21) días. La mediana de células obtenidas en el cultivo en las placas de Biolamina al alcanzar subconfluencia y en el momento del primer pase celular fue de $1,2 \times 10^6$ (1×10^6 - $1,4 \times 10^6$) células (Tabla 6).

Sujeto	Días de cultivo en la placa con Biolamina	Nº células al alcanzar subconfluencia
conejo 1	11	$1,2 \times 10^6$
conejo 2	15	$1,3 \times 10^6$
conejo 3	11	$1,1 \times 10^6$
conejo 4	17	$1,2 \times 10^6$
conejo 5	16	$1,4 \times 10^6$
conejo 6	13	1×10^6
conejo 7	16	$1,3 \times 10^6$
conejo 8	16	$1,2 \times 10^6$
conejo 9	13	$1,2 \times 10^6$
conejo 10	17	$1,3 \times 10^6$
conejo 11	14	$1,2 \times 10^6$
conejo 12	14	$1,1 \times 10^6$
conejo 13	17	$1,2 \times 10^6$
conejo 14	21	$1,4 \times 10^6$
conejo 15	11	$1,1 \times 10^6$
conejo 16	15	1×10^6
conejo 17	20	$1,3 \times 10^6$
conejo 18	20	$1,3 \times 10^6$
conejo 19	18	$1,2 \times 10^6$
conejo 20	11	1×10^6

conejo 21	11	$1,1 \times 10^6$
conejo 22	13	$1,2 \times 10^6$
Mediana	15	$1,2 \times 10^6$
Rango	11-21	$1 \times 10^6 - 1,4 \times 10^6$

Tabla 6: Evaluación del procesamiento, cultivo y expansión de células uroteliales: número de días de cultivo en la placa con Biolamina, número de células obtenidas en el cultivo al alcanzar subconfluencia celular en la placa (previo al primer pase celular).

EVALUACIÓN DE LA SIEMBRA DE LAS CÉLULAS UROTELIALES EN LA MATRIZ Y CREACIÓN DEL EPITELIO ESTRATIFICADO

En el 100% de los casos se obtuvo adherencia de las células expandidas a la matriz SIS. La mediana de días de cultivo sobre la matriz de SIS en interfase aire-líquido hasta obtener un epitelio estratificado fue de 20,5 (18-23) días (Tabla 7). En el 100% de los casos se obtuvo un epitelio estratificado de al menos 3 capas celulares similar a una uretra nativa.

Sujeto	Días de cultivo sobre el SIS en interfase aire-líquido
conejo 1	18
conejo 2	21
conejo 3	21
conejo 4	18
conejo 5	22
conejo 6	19
conejo 7	21
conejo 8	20
conejo 9	20
conejo 10	21
conejo 11	20
conejo 12	19
conejo 13	23
conejo 14	19
conejo 15	19
conejo 16	18
conejo 17	23
conejo 18	23
conejo 19	20
conejo 20	23
conejo 21	23
conejo 22	21
Mediana	20,5
Rango	18-23

Tabla 7: Evaluación de la siembra de las células uroteliales en la matriz y creación del epitelio estratificado: número de días de cultivo sobre la matriz de SIS en interfase aire-líquido para obtener estratificación celular.

CARACTERIZACIÓN CELULAR Y ESTUDIO HISTOLÓGICO

En todos los casos se encontró un epitelio estratificado de 3-5 capas de células sin metaplasia o atipia celular. Todos los cultivos presentaban recubrimiento celular de al menos 3 capas celulares en toda la superficie de la matriz de SIS (confluencia celular total). La matriz de SIS se mantuvo intacta en todos los casos sin presentar degradación o rotura en los cultivos. El estudio de inmunoensayo demostró la presencia células uroteliales positivas para CK7, con mayor positividad del marcador en las capas celulares más superficiales. El tejido uretral creado presentaba una similitud a la uretra nativa del conejo en cuanto a estratificación y fenotipo celular (Figura 25).

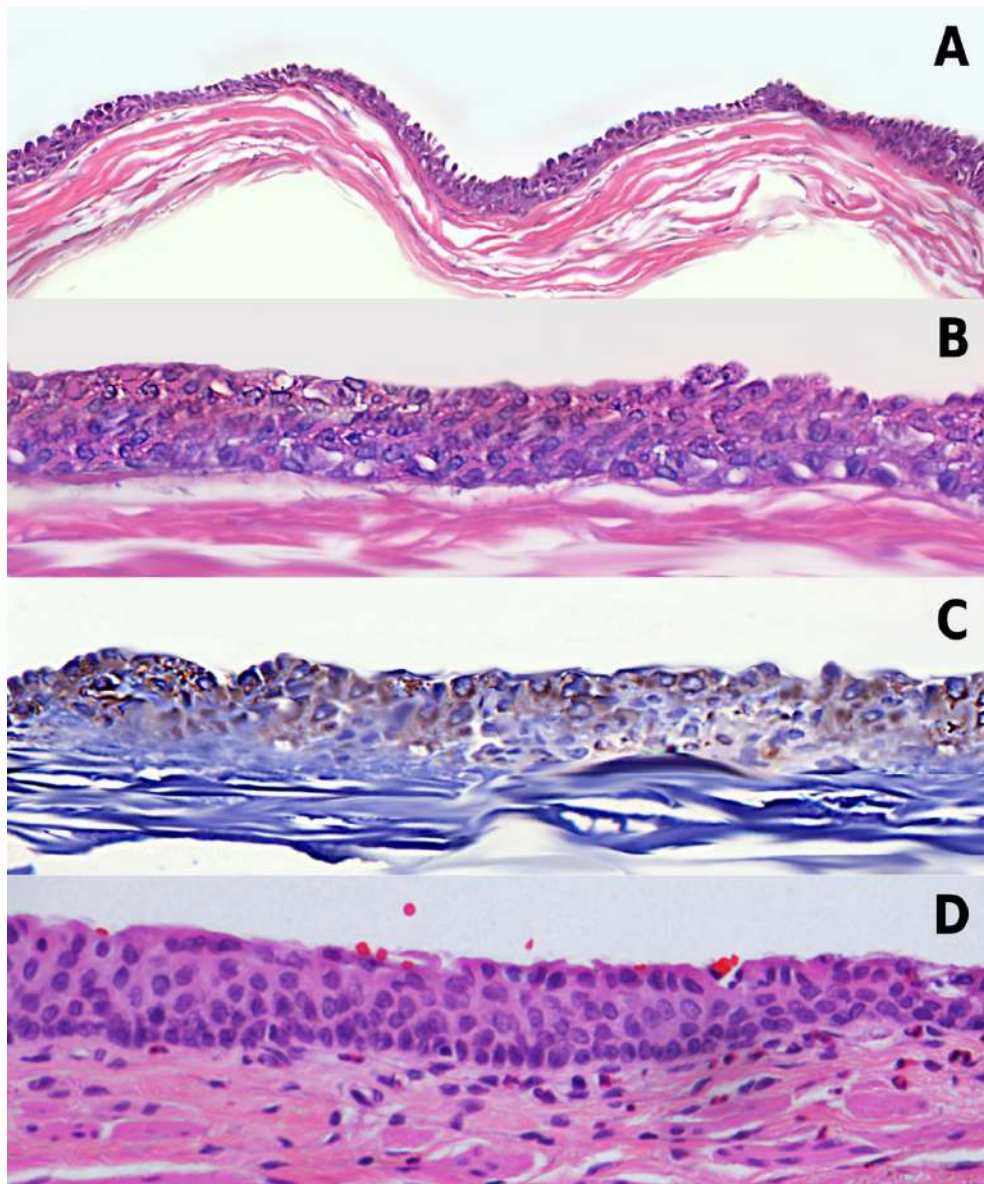


Figura 25: Tejido uretral creado mediante ingeniería tisular. (A) Tinción de H&E del tejido uretral que muestra un urotelio estratificado de 3 a 5 capas celulares sembrado en la matriz SIS en aumento 40x. (B) Igual que (A) con un aumento de 100x. (C) Tinción inmunohistoquímica con marcador de células uroteliales CK7 donde se aprecia en marrón la tinción positiva del marcador contrateñido con hematoxilina. (D) Ejemplo de un corte histológico con H&E de la uretra peneana nativa de conejo, donde se puede apreciar la similitud del cultivo creado con el nativo.

RESULTADO DE LA URETROPLASTIA Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL TEJIDO URETRAL CREADO

La uretroplastia se realizó en el grupo B (10 conejos) y en el grupo C (10 conejos), después de una mediana de 40 (30-49) días, tiempo necesario en cada conejo para llevar a cabo el desarrollo de los tejidos uretrales de ingeniería tisular. No se realizó reparación uretral en el grupo A (control).

BIENESTAR ANIMAL

El procedimiento fue realizado con buena tolerancia por los sujetos, requiriendo analgesia los 3 primeros días postoperatorios por molestias menores (puntuación de 1 punto (rango 0-3) en la escala de bienestar). Todos presentaron hematuria leve y que cedió de forma espontánea. No hubo episodios de retención de orina. Ningún animal precisó sacrificio prematuro por motivos de bienestar animal (Tabla 8).

Sujeto	Puntuación en la escala de bienestar
conejo 1	1
conejo 2	2
conejo 3	1
conejo 4	0
conejo 5	2
conejo 6	1
conejo 7	0
conejo 8	0
conejo 9	1
conejo 10	2
conejo 11	3
conejo 12	1
conejo 13	0
conejo 14	1
conejo 15	2
conejo 16	3
conejo 17	2
conejo 18	1
conejo 19	2
conejo 20	1
conejo 21	0
conejo 22	1
Mediana	1
Rango	0-3

Tabla 8: Puntuación obtenida para cada conejo en la escala de bienestar durante las dos semanas postoperatorias en la que se aplicó del protocolo de supervisión. El valor de puntuación corresponde al valor máximo obtenido para cada conejo durante todo el periodo de supervisión.

RESULTADO DE LA RESISTENCIA DEL MATERIAL CREADO A LA MANIPULACIÓN QUIRÚRGICA

La resistencia a la manipulación quirúrgica fue adecuada tanto para la matriz de SIS sola como para el tejido uretral creado por ingeniería tisular. No hubo roturas ni deformaciones en ambos materiales durante el procedimiento. Además la cara del constructo que contenía las células se identificó fácilmente con lupas en los casos del grupo C.

RESULTADOS MACROSCÓPICOS DE LA URETROPLASTIA

En el examen macroscópico de los penes a las 4 semanas de la cirugía, todos los conejos del grupo B (100%) presentaron dehiscencia de la uretroplastia o una gran fístula. En el grupo C, 5 de 10 conejos (50%) presentaron una reparación uretral completa sin fístulas ni estenosis, y 5 de 10 (50%) presentaron reparación casi total pero con una pequeña fístula uretral. La mediana del área calculada del defecto uretral tras la uretroplastia en el grupo B fue de 61,03 (33,99-70,49) mm² y en el grupo C de 0,31 (0-12,51) mm² con diferencia estadísticamente significativa ($p = 7,85 \times 10^{-5}$) (Figura 26). Los conejos del grupo A, en los que el modelo se dejó intacto, no hubo cambios en el tamaño del defecto a los 3 meses de la creación del modelo ($p = 0,34$) (Tabla 9) (Véase también Figuras 31 y 32).

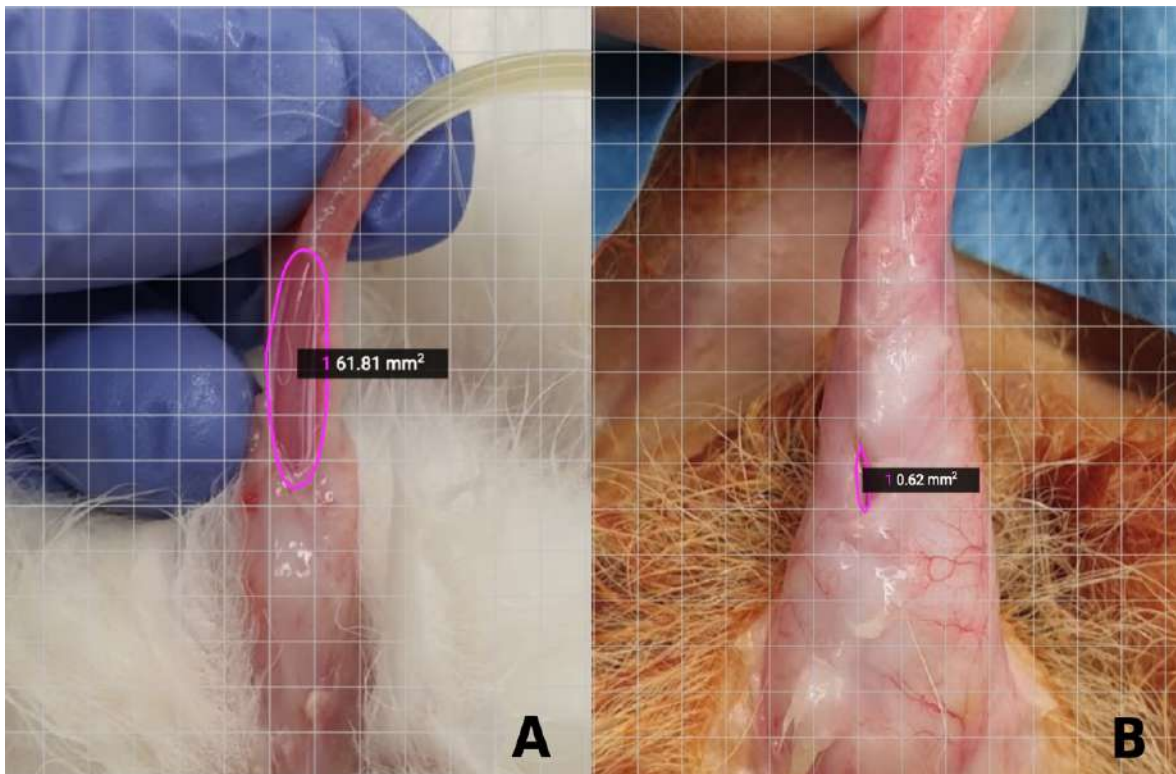


Figura 26: Ejemplo del resultado macroscópico de la uretroplastia de un conejo del grupo B y del grupo C (A) Área uretral reparada del conejo 17 del grupo B. (B) Área uretral reparada del conejo 20 del grupo C.

GRUPO A Control			GRUPO B Uretroplastia con matriz SIS			GRUPO C Uretroplastia con tejido uretral de ingeniería tisular		
Sujeto	Área inicial	Área final	Sujeto	Área inicial	Área final	Sujeto	Área inicial	Área final
conejo 1	70,66	70,65	conejo 3	71,91	48,03	conejo 4	72,67	0
conejo 2	72,25	72,25	conejo 5	67,75	61,15	conejo 7	71,81	0
			conejo 7	74,07	42,83	conejo 11	67,09	0
			conejo 9	72,97	33,99	conejo 12	70,99	3,24
			conejo 11	69,05	64,24	conejo 14	68,19	12,51
			conejo 13	72,26	70,49	conejo 16	67,13	0
			conejo 15	68,69	61,14	conejo 19	69,36	0
			conejo 17	65,10	61,81	conejo 20	74,54	0,62
			conejo 19	67,62	60,91	conejo 21	71,90	1,01
			conejo 21	70,19	45,93	conejo 23	69,69	10,55
Mediana	71,46	71,45	Mediana	69,62	61,03	Mediana	70,34	0,31
Rango	70,66-72,25	70,65-72,25	Rango	67,62-74,07	33,99-70,49	Rango	67,09-74,54	0-12,51
U Mann Whitney (área inicial grupo A - área final grupo A)							$p = 0,34$	
U Mann Whitney (área inicial grupo B- área inicial grupo C)							$p = 0,46$	
U Mann Whitney (área final grupo B- área final grupo C)							$p = 7,85 \times 10^{-5}$	

Tabla 9: Área calculada del defecto uretral inicial y final de todos los grupos determinada la aplicación SketchAndCalcTM.

No se identificaron curvaturas del pene en ninguna muestra. En cuanto al aspecto estético, éste fue deficiente en el grupo B, con una puntuación mediana de 2 (1-4) puntos en la escala estética subjetiva. Sin embargo, en el grupo C el resultado estético fue favorable, con una puntuación mediana de 8 (5-9) puntos ($p = 7,85 \times 10^{-5}$).

GRUPO B Uretroplastia con matriz SIS		GRUPO C Uretroplastia con tejido uretral de ingeniería tisular	
Sujeto	Valoración estética	Sujeto	Valoración estética
conejo 3	2	conejo 4	8
conejo 5	2	conejo 7	8
conejo 7	2	conejo 11	9
conejo 9	1	conejo 12	7
conejo 11	1	conejo 14	5
conejo 13	1	conejo 16	9
conejo 15	2	conejo 19	9
conejo 17	2	conejo 20	8
conejo 19	2	conejo 21	8

conejo 21	4	conejo 23	6
Mediana	2	Mediana	8
Rango	1-4	Rango	5-9
U Mann Whitney (estética grupo B- estética grupo C)			$p = 7,85 \times 10^{-5}$

Tabla 10: Área calculada del defecto uretral inicial y final de todos los grupos determinada la aplicación SketchAndCalcTM.

RESULTADOS RADIOLÓGICOS DE LA URETROPLASTIA

En la evaluación radiológica mediante cistouretrografía miccional se confirmaron los casos con fístula uretral. En el grupo A se identificó una gran fuga urinaria en el sitio del defecto, con uretra posterior normal y sin signos de estenosis. En el grupo B, 10 de 10 (100%) conejos presentaron fístula urinaria, en comparación con 5 de 10 (50%) en el grupo C. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,04$). No se identificaron estenosis ni divertículos en ningún animal (Figura 27) (Véase también Figuras 31 y 32).

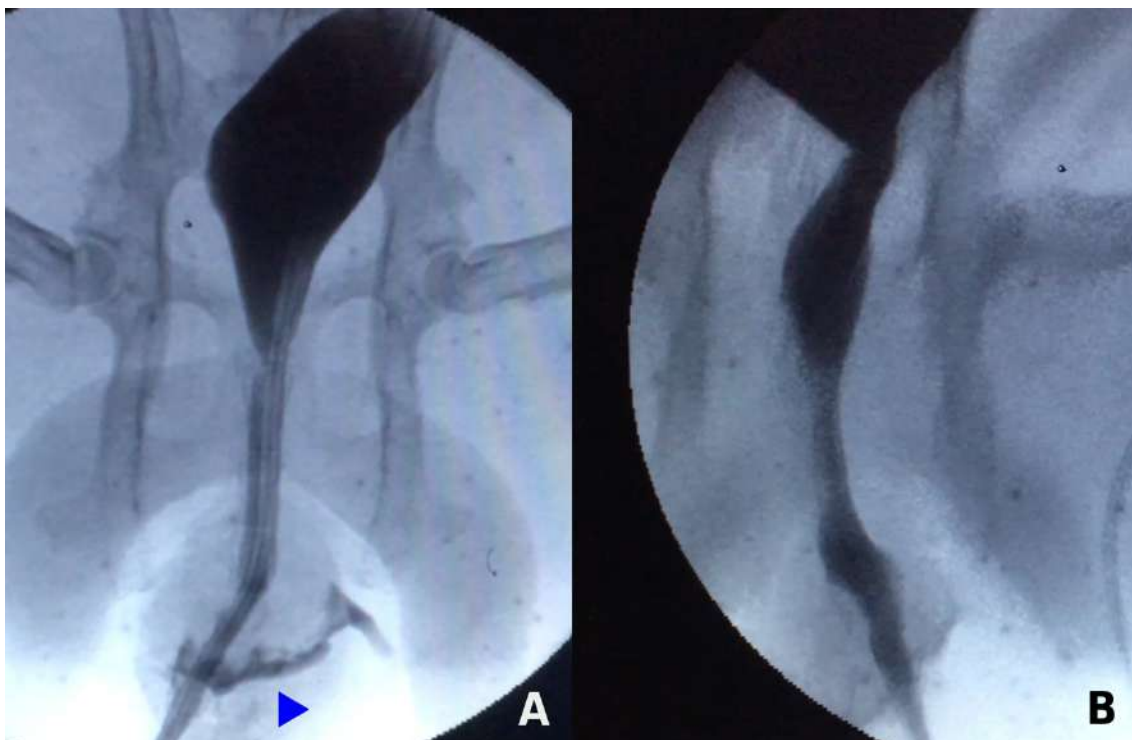


Figura 27: Cistouretrografía miccional de conejos del grupo B y C. (A) Cistouretrografía del conejo 11 del grupo B donde se aprecia la fístula urinaria a nivel del defecto uretral (flecha azul). (B) Cistouretrografía del conejo 16 del grupo C donde se constata la ausencia de fístulas.

RESULTADOS HISTOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA URETROPLASTIA

En el examen histológico, todos los conejos del grupo B tenían ausencia de uretra ventral en las áreas de defecto de hipospadias no corregido, con continuidad entre la uretra dorsal y la piel

del pene y áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la uretra (Figura 28) (Véase también Figuras 31 y 32).

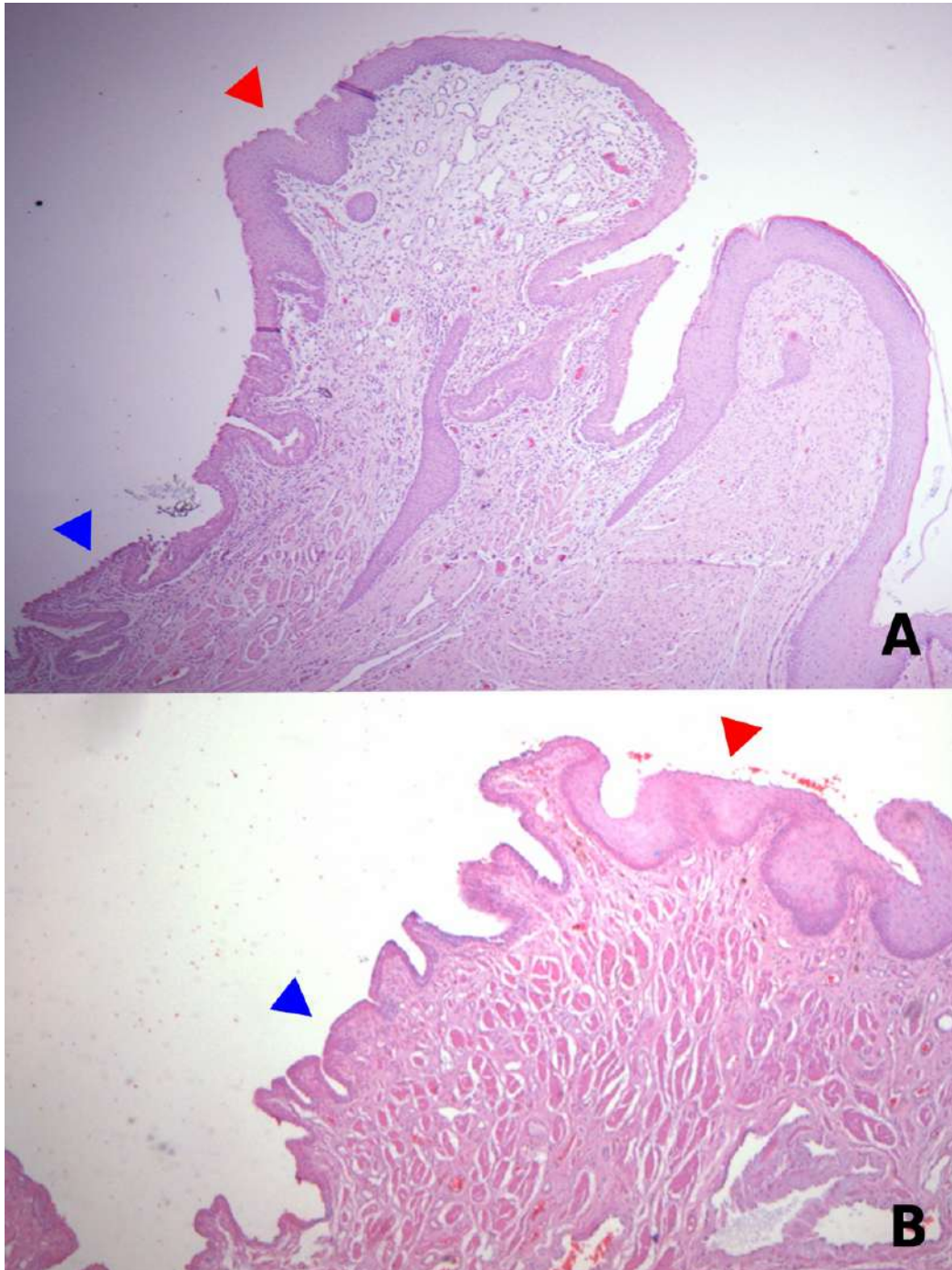


Figura 28: Imágenes histológicas del conejo 3 del grupo B en donde se aprecia una sección axial del pene a nivel del defecto uretral final tras la uretroplastia. (A) Corte axial donde se aprecia la uretra nativa (flecha azul) que se continúa con metaplasia escamosa a nivel de los bordes del defecto uretral (B) Detalle donde se aprecia el cambio de la uretra nativa (flecha azul) a la metaplasia escamosa adyacente a la piel peneana externa (flecha roja).

En el grupo C, los conejos con corrección total del defecto uretral tenían una uretra ventral con tejido urotelial multicapa, tejido subcutáneo y cutáneo; y los conejos con fístula, la uretra ventral tenía algo de metaplasia escamosa, con el resto de la uretra reparada con urotelio normal. Se

identificó la presencia de tejidos vasculares y conectivos en las áreas de uretra reparadas. No se reconocieron atipias ni tumores en ninguna de las muestras (Figura 29) (Véase también Figuras 31 y 32).

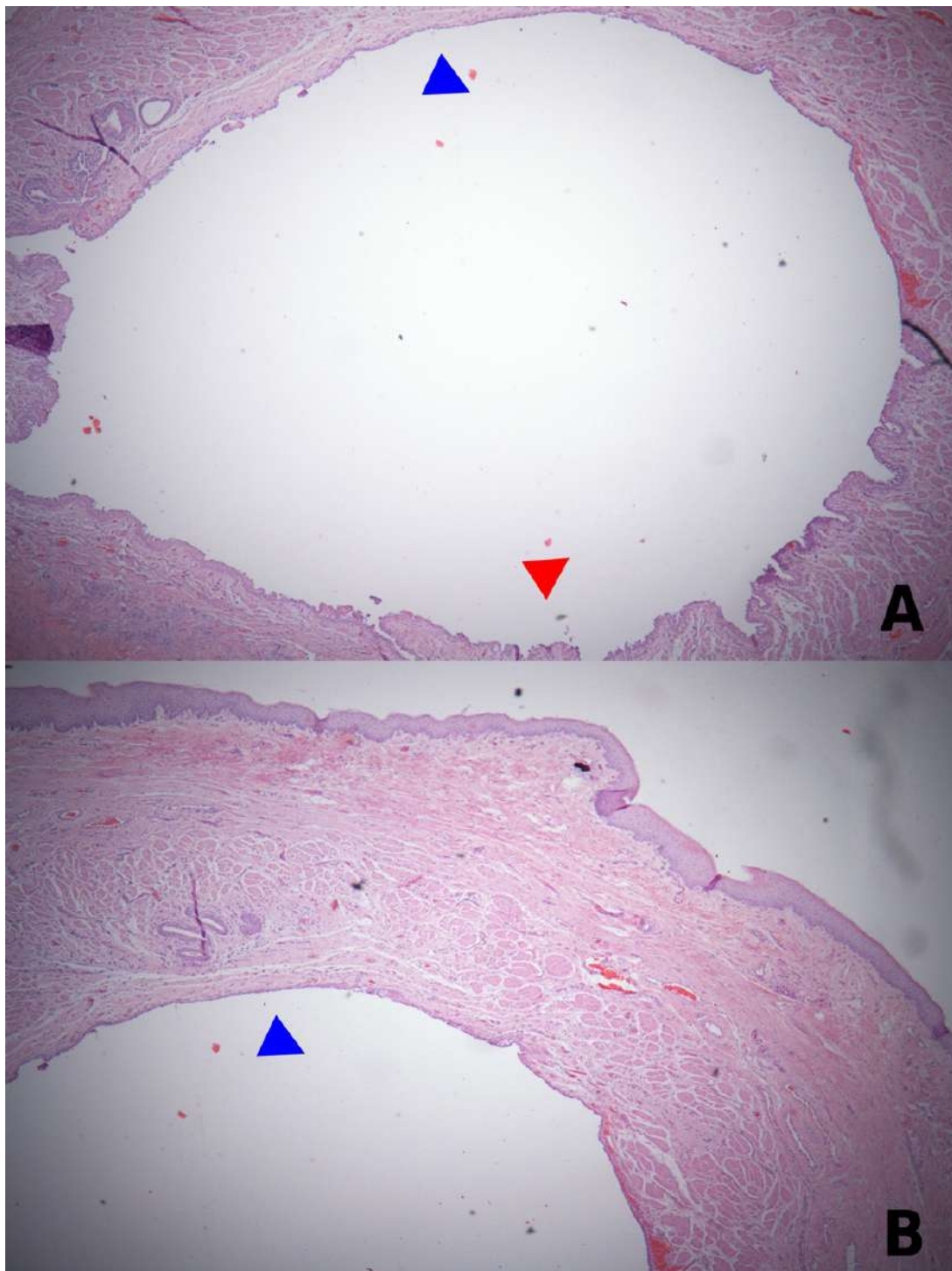


Figura 29: Imágenes histológicas del conejo 4 del grupo C en donde se aprecia una sección axial del pene a nivel de la corrección del defecto uretral. (A) Corte axial a bajo aumento donde se aprecia el cilindro uretral completamente corregido, con la zona de la neouretra en la parte superior (flecha azul) y la uretra nativa en la parte inferior de la imagen (flecha roja). (B) Detalle del mismo corte axial donde se aprecia la neouretra, el tejido conectivo con vascularización subyacente a la uretra y la piel. No se aprecian zonas de metaplasia o atipia celular en la uretra corregida.

El estudio inmunohistoquímico identificó células CK7 positivas en las capas superficiales de la del urotelio en las áreas de reparación uretral en ambos grupos (Figura 30).

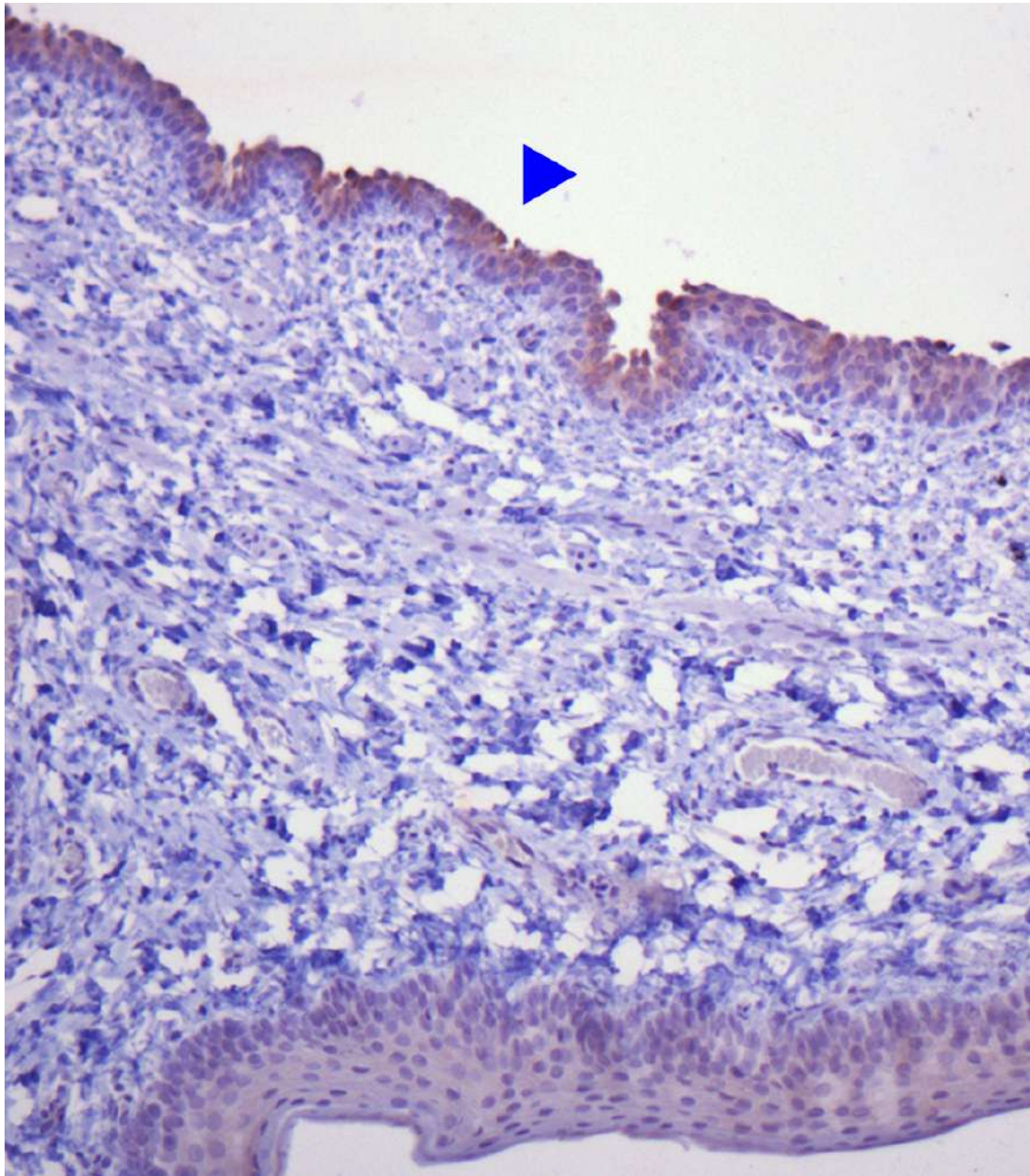


Figura 30: Imagen inmunohistoquímica de una zona de uretra reparada del conejo 4 del grupo C. Se aprecia en la parte superior (flecha azul) el epitelio urotelial estratificado con tinción positiva (marrón) para CK7. Además se aprecia en las capas inferiores el tejido subcutáneo subyacente y la piel.

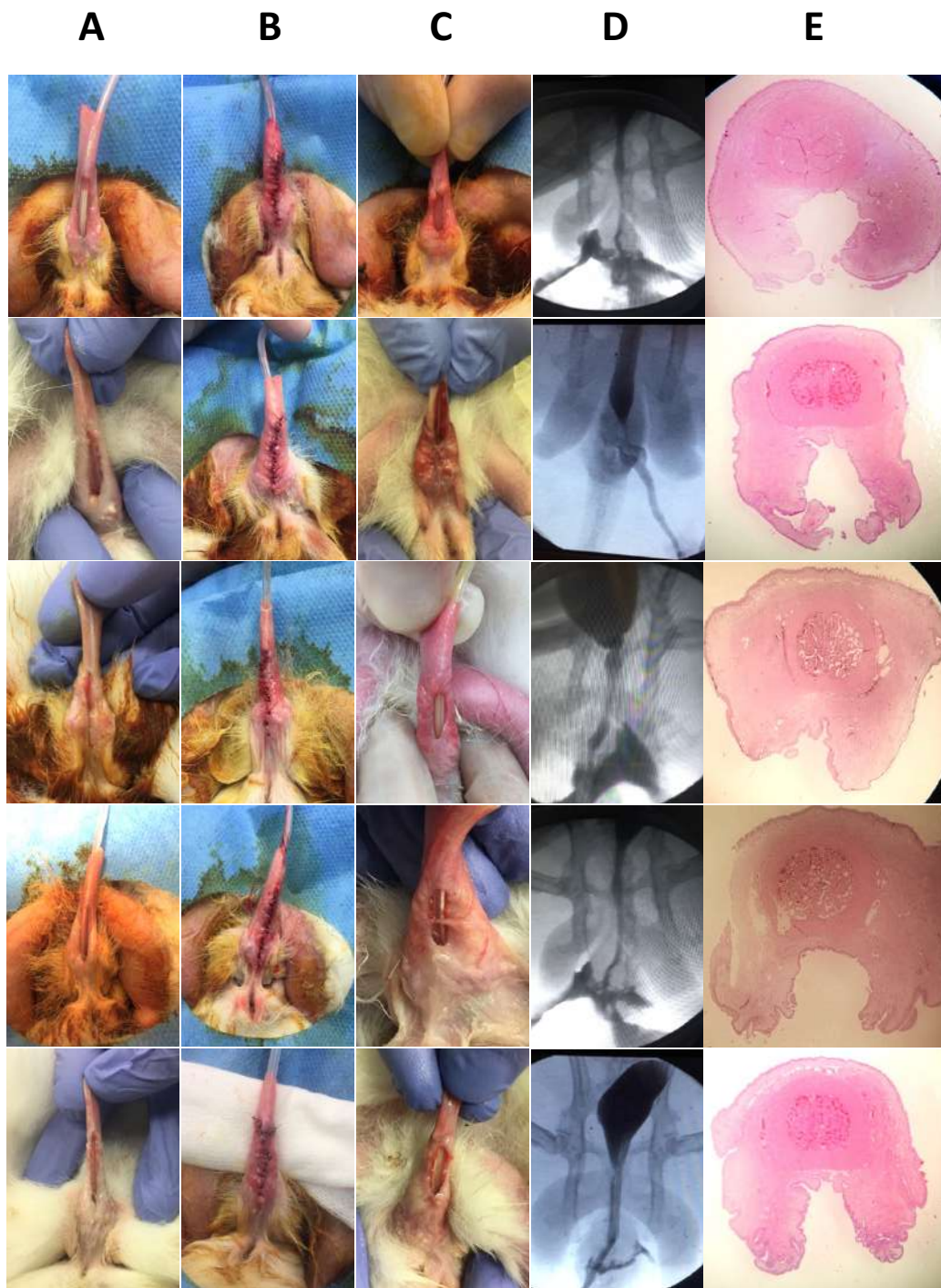


Figura 31.1: Conejos del grupo B (Uretroplastia con matriz SIS): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción uretral con la matriz de submucosa del intestino delgado porcino SIS Cook-Biotech®. (B) Aspecto postoperatorio inmediato de la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrografía miccional que muestra fístula uretral. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral que demuestra la ausencia de la uretra ventral y la continuidad entre la uretra dorsal (abierta) y la piel del pene con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la uretra.

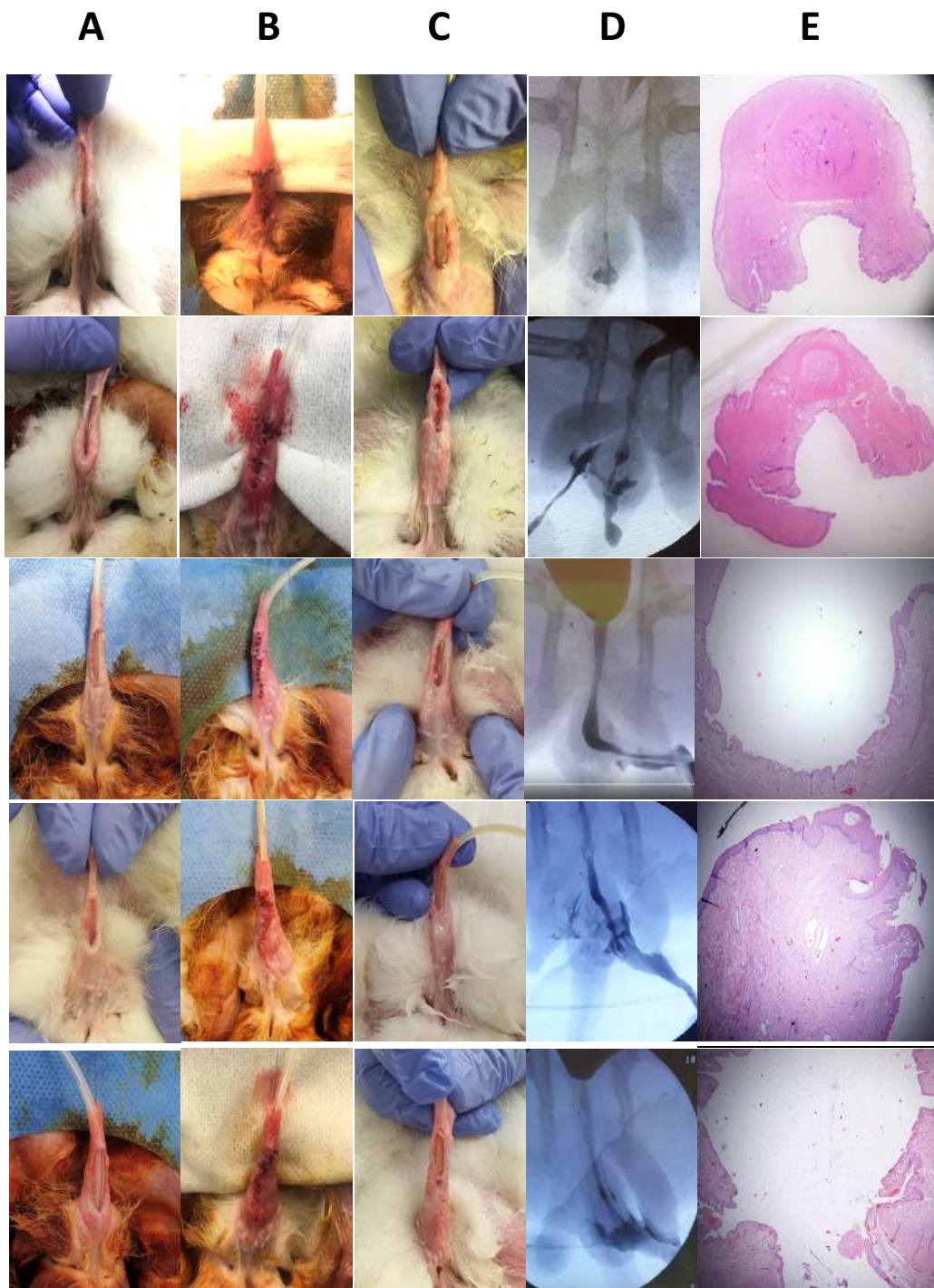


Figura 31.2: Conejos del grupo B (Uretroplastia con matriz SIS): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción uretral con la matriz de submucosa del intestino delgado porcino SIS Cook-Biotech®. (B) Aspecto postoperatorio inmediato de la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrografía miccional que muestra fístula uretral. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral que demuestra la ausencia de la uretra ventral y la continuidad entre la uretra dorsal (abierta) y la piel del pene con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la uretra.

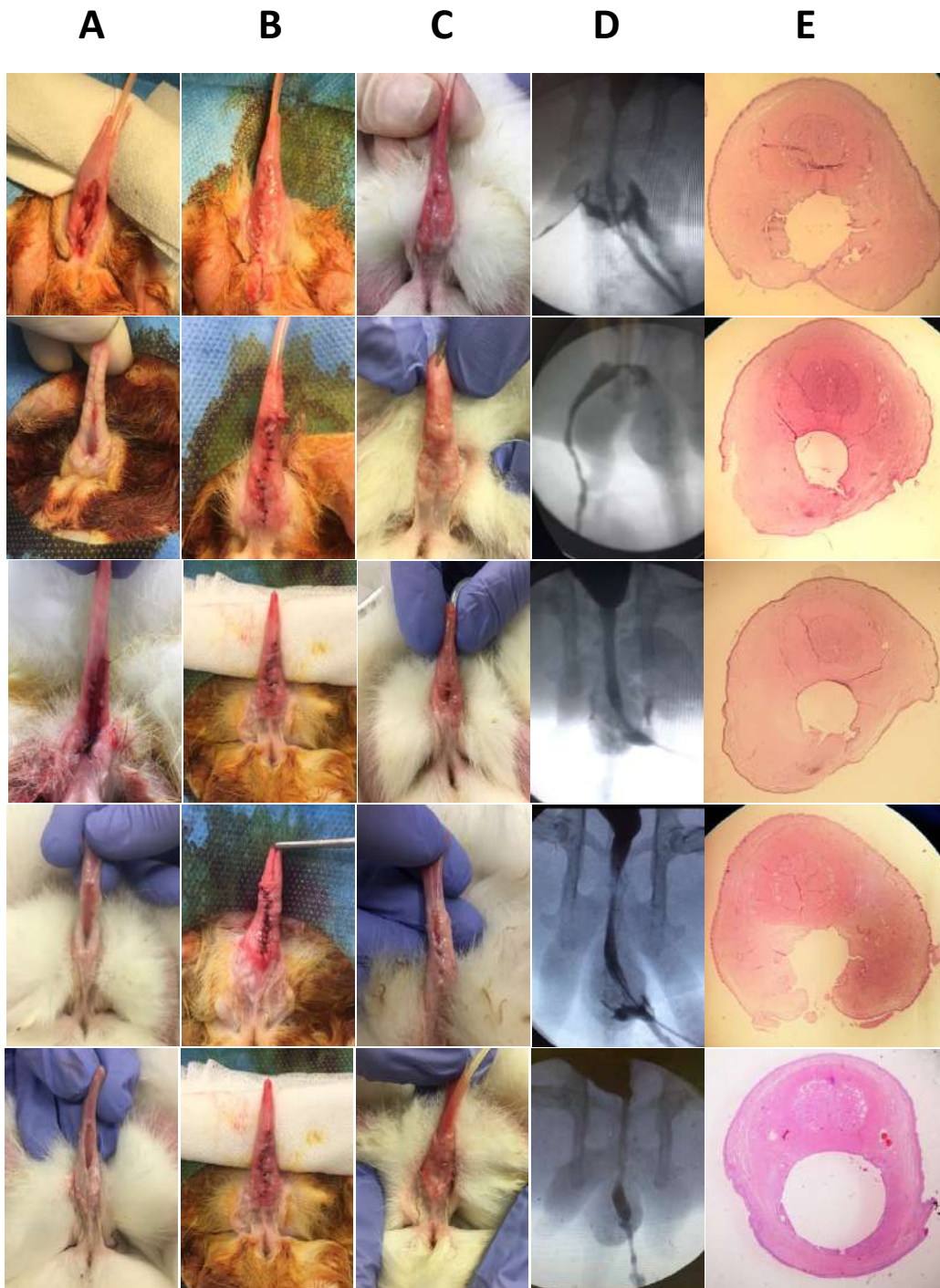


Figura 32.1: Conejos del grupo C (Uretroplastia con tejido uretral creado con ingeniería tisular): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción. (B) Aspecto postoperatorio inmediato tras la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistoureterograma miccional que muestra fístula uretral o reparación uretral completa sin fístula. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral reparada que muestra el tejido urotelial multicapa o muestra una fístula uretral con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la fístula (H&E).

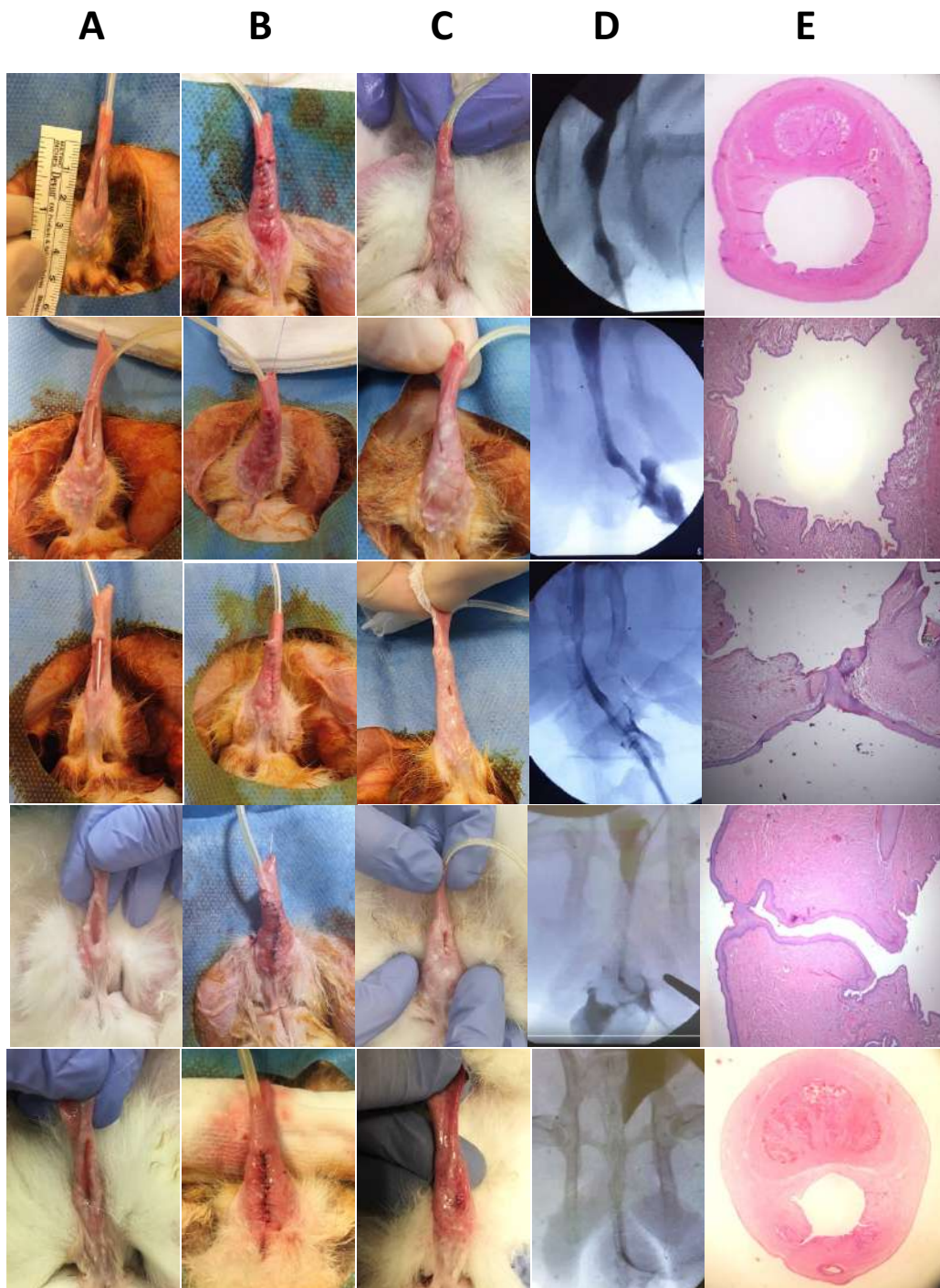


Figura 32.2: Conejos del grupo C (Uretroplastia con tejido uretral creado con ingeniería tisular): (A) Defecto uretral antes de la reconstrucción. (B) Aspecto postoperatorio inmediato tras la uretroplastia. (C) Resultado de la uretroplastia 4 semanas después de la cirugía. (D) Cistouretrograma miccional que muestra fístula uretral o reparación uretral completa sin fístula. (E) Corte histológico axial del pene en el área del defecto uretral reparada que muestra el tejido urotelial multicapa o muestra una fístula uretral con áreas de metaplasia escamosa en los sitios laterales de la fístula (H&E).

DISCUSIÓN

En el presente estudio podemos resumir 3 hallazgos principales: (1) Se creó de manera exitosa un modelo hipospadias proximal en conejos crónico, reproducible y adecuado para estudio de uretroplastias; (2) Se desarrolló mediante técnicas de ingeniería tisular un tejido uretral adecuado para uretroplastias, a partir de la técnica del lavado vesical como fuente de células y la matriz SIS como soporte; y (3) La uretroplastia reconstructiva con tejido uretral de ingeniería tisular fue superior al uso de de matriz SIS aislada en el modelo de hipospadias de conejo.

CREACIÓN DEL MODELO DE HIPOSPADIAS PROXIMAL EN CONEJOS

El hipospadias proximal es una anomalía compleja cuyo tratamiento en la actualidad sigue siendo un reto, presentando un gran número de complicaciones con las técnicas actuales [94]. El desarrollo de estudios con técnicas y modelos estandarizados de hipospadias son necesarios para poder avanzar en esta área y permitir la comparación entre distintas investigaciones.

El modelo de hipospadias en conejo constituye uno de los mejores modelos animales para el estudio de técnicas de uretroplastia debido a sus características anatómicas [95-97]. Aunque en la actualidad el conejo es uno de los animales más usados como modelo para estudios de la uretra, no existe ningún modelo estandarizado. Además, la gran mayoría de los modelos de defecto uretral creados en conejos, realizan dicho defecto en el mismo procedimiento de reparación [20, 87, 98], sin permitir el asentamiento del defecto y la cicatrización de los tejidos adyacentes al defecto, lo que podría modificar los resultados de la reparación de la uretra.

En nuestro modelo de hipospadias, se creó un gran defecto uretral ventral crónico y estable a largo plazo con una variación mínima del tamaño del defecto entre animales. Una de las ventajas de nuestro modelo es que el defecto se creó previamente a la reparación, y ese defecto se mantuvo patente a lo largo del tiempo, garantizando que la técnica que vayamos a estudiar en el modelo sea el único elemento implicado en la reparación uretral, y no existe un re-cierre propio de la uretra nativa. Además, el defecto creado en nuestro modelo mantuvo una dimensión constante con poca variabilidad entre los sujetos y presentó tejido epitelial cutáneo queratinizado en transición con el urotelio nativo, tal cual existe en los defectos uretrales en la práctica clínica.

En el hipospadias humano, el déficit uretral suele asociarse a un defecto del cuerpo esponjoso, que da una mala vascularización al lecho de la herida [99]. Los modelos animales de hipospadias suelen ser defectos de tamaño discreto manteniendo tejido uretral adyacente con buen tejido esponjoso y buena vascularización, lo que podría dar mejores resultados a los estudios experimentales en comparación con la práctica clínica. Por eso, en este estudio se ha intentado crear un gran defecto uretral, para reducir al máximo el tejido uretral ventral y por tanto disminuir el tejido esponjoso que proporciona vascularización para la neouretra, y de esta manera intentar reproducir la realidad clínica de los defectos complejos.

Ninguno de los animales presentó estenosis uretrales, lo que demuestra que el defecto uretral era lo suficientemente grande como para evitar el re-cierre del defecto con tejido adyacente. Además, no fue necesario mantener un sondaje vesical en los conejos puesto que el defecto creado, gracias a la sutura realizada, provocaba una mínima o nula inflamación de los tejidos y por tanto no había riesgo de retención urinaria. Otras características favorables del presente modelo animal, es que se pudo constatar en el examen radiológico con cistouretrografía que no existía estenosis en el resto de la uretra, ni tampoco signos de inflamación o fibrosis en el estudio histológico. Ello permite una evaluación de técnicas de uretroplastia más fidedigna, y en caso de presentarse estas lesiones atribuirse únicamente a la técnica realizada.

DESARROLLO DE TEJIDO URETRAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular para la reconstrucción uretral constituye una solución para los problemas relacionados con los sustitutos uretrales tradicionales para reparación uretral, tales como la falta de disponibilidad, la morbilidad del sitio donante y las diferencias mecánicas y biológicas de dichos tejidos respecto a la uretra normal, que pueden provocar complicaciones en la reparación quirúrgica como estenosis, fístulas, metaplasia o neoformaciones. La ingeniería tisular permite la creación de una neouretra en el laboratorio, que imita las funciones de la uretra nativa y que esté disponible en todo momento y en la cantidad necesaria para la reparación [10, 11, 12].

El tejido uretral creado en este estudio mediante técnicas de ingeniería tisular presenta algunas ventajas en comparación con otros tipos de construcciones de ingeniería tisular uretral descritas previamente [8, 10, 14, 15], que lo hacen ideales para su traslación a la práctica clínica.

En primer lugar el material elegido como soporte para crear el tejido uretral, la matriz SIS, es un biomaterial que proviene de la descelularización de la submucosa de intestino delgado porcino, y que contiene colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y factores de crecimiento que promueven de manera muy eficaz la cicatrización. Múltiples estudios han demostrado que diferentes tipos de células se adhieren al SIS, proliferan y migran a la matriz y se diferencian, y que son útiles para la reparación de diversos tipos de heridas [73]. Esta matriz está comercialmente aprobada para uso humano desde 2004, y su seguridad y eficacia en la práctica clínica ha sido ampliamente probada para la reparación de diferentes tipos de tejidos [100-103]. Se han demostrado resultados exitosos en el uso de SIS sin células sembradas para la reparación uretral en múltiples estudios, con buena tolerancia de este biomaterial, sin generar inmunogenicidad ni rechazo [11,12]. De todas las matrices empleadas en ingeniería tisular, ésta ha sido la más utilizada tanto en estudios preclínicos como clínicos [11]. Por tanto es un biomaterial muy seguro para uso humano y además fácilmente disponible comercialmente.

La otra gran ventaja del tejido uretral creado en este estudio es la fuente de las células mediante lavado vesical. Este procedimiento es muy poco invasivo, con una mínima morbilidad sobre el paciente, con el que se evitan lesiones en el sitio donante, y que brinda la posibilidad de repetirse cuantas veces sea necesario [21-25]. En la práctica clínica, los lavados de vejiga se

pueden realizar de manera ambulatoria sin necesidad de anestesia general y sin requerir ninguna preparación especial. Con la técnica de lavado vesical optimizada en este estudio, fue posible obtener células uroteliales viables para cultivo sólo con un procedimiento en la gran mayoría de los casos.

El tipo de células que se obtienen del lavado vesical son células uroteliales diferenciadas con baja capacidad de replicación, y por tanto se consideran más seguras para evitar la aparición de replicación no controlada y neoformaciones de tipo teratoma, en comparación con otros tipos celulares usados en la ingeniería tisular como las células madre o células progenitoras [85].

La adherencia celular, la proliferación y estratificación de las células uroteliales sobre la matriz SIS fue excelente en el presente estudio. La mayoría de los estudios que utilizan la matriz SIS para la reparación uretral lo hacen sin sembrar células [11], y tradicionalmente se usan otro tipo de matrices para ser sembradas como la matriz BAM (bladder acellular matrix) o ADM (acellular dermal matrix). Sin embargo con este estudio se ha demostrado que la matriz SIS es una membrana igual de eficaz para general tejido urotelial estratificado y que puede ser también sembrado.

El tipo de cultivos celulares y técnicas de expansión simplificados usados en este estudio, sin utilizar células alimentadoras o co-cultivos con células heterólogas productoras de factores de crecimiento o cualquier otra sustancia no permitida para la aplicación humana, también es una ventaja de nuestro constructo. El proceso de creación de este tejido uretral puede replicarse para uso en humanos en un laboratorio con condiciones según la normativa de “Buenas Prácticas de Fabricación” o normativa GMP (Good Manufacturing Practices). La única sustancia que debe sustituirse en un entorno humano es el Suero Fetal Bovino en el medio de cultivo celular, que puede ser sustituido por el suero sanguíneo del paciente en pequeña cantidad. Además, con el proceso simplificado de cultivo se logró crear un tejido uretral de múltiples capas, sin requerir biorreactores costosos o máquinas de laboratorio complejas. Los cultivos podrían elaborarse en laboratorios estándar acreditados según la normativa GMP para uso humano.

Por último, el tejido uretral creado en este trabajo presenta una resistencia a la manipulación quirúrgica comparable a la resistencia de la matriz SIS aislada, sin presentar desgarros o deterioro durante su implantación. Como se ha descrito previamente, la matriz SIS es el biomaterial más empleado en la práctica clínica para la reparación uretral [11] y es usado ampliamente en la actualidad para el tratamiento de curvaturas penélicas [103], y por tanto su resistencia y tacto quirúrgico es bien conocida por los urólogos pediátricos y de adultos, siendo esto una ventaja para su aplicación en la práctica clínica.

URETROPLASTIA CON TEJIDO URETRAL DE INGENIERÍA TISULAR

La uretroplastia reconstructiva con tejido uretral creado mediante la siembra de matriz SIS con células uroteliales de lavado vesical fue superior al uso de matrices SIS acelulares en nuestro estudio. La uretroplastia con nuestro tejido uretral permitió una reparación completa en la

mitad de los casos, con pequeñas fístulas en la otra mitad, a pesar de que no haber empleado un catéter uretral en el postoperatorio nuestros animales, debido a motivos técnicos (mordedura de las sondas por parte de los conejos). En un escenario clínico, donde se pudiera usar un catéter uretral, el porcentaje de aparición de las fístulas podría ser mucho menor. Además, el tejido uretral creado permitió una mejor cicatrización del defecto uretral, lo que conllevó a un mejor resultado cosmético de la reparación. Este resultado es concordante con la evidencia científica previa de estudios preclínicos sobre este tema, en los que los constructos de matrices sembradas con células presentan una reducción significativa de los efectos secundarios después de la reparación uretral y tiene resultados de corrección uretral superiores en comparación con el uso de matrices aisladas sin células [10-12, 18-20, 104, 105]. Se ha descrito que el uso de matrices aisladas es adecuada para la reparación de defectos muy pequeños menores de 5mm de longitud, donde las células nativas pueden migrar y cubrir la matriz desde los bordes adyacentes, pero que en defectos mayores, sólo se consigue regeneración celular en los bordes, con fibrosis y fallo de la uretroplastia [106].

La traslación a la práctica clínica de los constructos sembrados con células ha sido escasa, y la interpretación de los resultados de los pocos estudios clínicos publicados es compleja, debido a diferentes limitaciones de dichos estudios, puesto que presentan tamaños muestrales pequeños, resultados a corto plazo y estudios de baja evidencia científica sin aleatorización o grupo de control [24, 25, 80, 107-109].

En otros estudios con animales y en humanos se ha descrito la reparación de la uretra usando un constructo tubular [18, 20, 107]. Sin embargo, en estudios clínicos se prefiere la realización de los procedimientos tipo "Inlay" (colocación del tejido en la cara ventral del pene y posterior tubulización en un segundo tiempo quirúrgico) u "Onlay" (colocación el tejido sobre la placa uretral para completar el cilindro uretral) [24,25,80, 108, 109]. Esto probablemente se debe a que mediante el uso de los procedimientos Inlay y Onlay está favorecido el prendimiento del tejido uretral, puesto que se consigue una mejor vascularización de éste tras su implantación, en comparación con la colocación del un tejido tubulizado. Sin embargo, el procedimiento tipo Onlay solo es posible usarlo en casos donde existe una placa uretral. Además, con la técnica Inlay se consigue aún mejor vascularización que con la de Onlay, puesto que esta surge del cuerpo cavernoso peneano. Por tanto los casos realmente complejos que requieran una reparación uretral completa en la práctica clínica, la técnica ideal es la realización de un procedimiento Inlay en 2 tiempos.

Es importante mencionar que en el presente estudio se ha realizado una reparación uretral de tipo Onlay para simplificar el modelo y evitar una intervención extra al conejo. Con el modelo creado se consigue simular la situación de vascularización pobre como en el hipospadias humano real, pero en la práctica clínica recomendaríamos utilizar este tipo de construcciones de forma Inlay, como un procedimiento de dos etapas, para mejorar la vascularización óptima del tejido implantado. Los constructos de tejido tubulizados a criterio de la doctoranda sólo serían una opción de tratamiento si una capa vascular o un pedículo arterial se añaden al constructo; de lo contrario, éste tendría dificultades para sobrevivir en un lecho quirúrgico mal vascularizado.

No se encontraron estenosis uretrales en ninguno de nuestros casos. Es posible que la matriz SIS, que es una matriz descelularizada de origen natural, reduzca el desarrollo de fibrosis en comparación con los materiales sintéticos. En estudios con matrices dérmicas, se ha demostrado que las matrices naturales tienen resultados superiores en comparación con las matrices sintéticas, ya que estas últimas parecen inducir más reacciones a cuerpos extraños, incluida la formación de células gigantes [110]. Lo que si apreciamos en nuestros casos es que el fallo de reparación de la uretroplastia conllevaba a dehiscencia y fuga de orina, más que a fibrosis y cierre estenótico. Esto probablemente se deba a la combinación del uso de una matriz natural tipo SIS que genera menor fibrosis y a que el modelo tenía un defecto uretral inicial muy amplio que dificultaba el cierre del dicho defecto con tejido fibrótico.

LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentra la falta de resultados a largo plazo. Esto es algo inherente a un estudio experimental, en el que no se puede perpetuar el mantenimiento a largo plazo de los animales por motivos éticos. Para demostrar la seguridad de los tejidos creados se requieren estudios a largo plazo en el entorno clínico, donde se garantice la ausencia de atipias o neoplasias de dichos tejidos y además se valoren los resultados a largo plazo de la uretroplastia. Para ello se requieren estudios piloto en casos seleccionados de manera traslacional a la clínica.

Una limitación del modelo experimental creado es la deficiencia del modelo animal para simular realmente a un hipospadias humano complejo. El modelo creado no reproduce la curvatura peneana asociada al defecto uretral en el hipospadias humano. Sin embargo, la corrección de la curvatura peneana es un procedimiento que se realiza previo a la uretroplastia y que suele ser exitoso con las técnicas ya descritas, y por tanto no precisa de ser estudiado experimentalmente. Otra limitación del modelo es que el cuerpo esponjoso era normal y el glande se mantuvo intacto. Esto puede conllevar a una mejor vascularización del lecho de la uretroplastia en nuestro estudio, en comparación con los casos clínicos típicos que requerirían el uso de técnicas de ingeniería tisular, que son casos complejos multioperados sin tejidos sanos, con abundante fibrosis y escasa vascularización. Para suplir esta limitación se ha intentado crear un defecto uretral ventral bastante amplio resecaando todo el tejido esponjoso ventral.

De igual forma, la no utilización del catéter uretral en el estudio podría ser una causa de incremento de las fístulas urinarias en todos los grupos estudiados. En un entorno clínico, donde se use un catéter uretral los resultados podrían ser distintos.

CONCLUSIONES

1. La creación de un modelo experimental de hipospadias proximal en conejos gigantes de Nueva Zelanda adecuado para el estudio de técnicas de uretroplastia, mediante la resección de un segmento elíptico amplio de tejido en la cara ventral del pene, fue exitosa.
 - 1.1. El modelo de hipospadias proximal fue inofensivo para el conejo sin provocar pérdida de bienestar animal.
 - 1.2. El modelo de hipospadias proximal fue estable en el tiempo y reproducible, presentando un defecto uretral crónico y de tamaño consistente en el tiempo, con muy poca variabilidad entre individuos.
 - 1.3. En el estudio radiológico de modelo de hipospadias mediante uretrocistografía miccional se identificó una gran fuga urinaria en el sitio del defecto sin re-cierre del defecto en el proceso de cicatrización, con uretra posterior normal y sin signos de estenosis.
 - 1.4. En el estudio histológico del modelo de hipospadias se encontró un amplio defecto uretral en la cara ventral del pene, presentando los bordes del defecto una vascularización normal, sin signos de metaplasia de tejido, fibrosis, inflamación o atipia celular.
 - 1.5. El modelo de hipospadias fue adecuado para el desarrollo del resto del estudio, mediante la uretroplastia del defecto con tejido uretral o con matriz SIS aislada.
2. El desarrollo de tejido uretral mediante ingeniería tisular fue exitoso, generándose un epitelio estratificado similar a una uretra nativa y adecuado⁹ para realización de uretroplastias.
 - 2.1. El lavado vesical fue una fuente fiable de células uroteliales viables para cultivo.
 - 2.2. Las células uroteliales obtenidas de lavado vesical fueron expandidas adecuadamente con el uso de Laminina recombinante humana.
 - 2.3. Las células uroteliales expandidas se sembraron exitosamente en matrices SIS.
 - 2.4. El estudio histológico del tejido uretral creado mostró un epitelio estratificado similar a una uretra nativa. El estudio inmunohistoquímico reveló la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial.
 - 2.5. El tejido uretral creado fue resistente a la manipulación quirúrgica y adecuado para su utilización en uretroplastias.
3. El uso de tejido uretral de ingeniería tisular creado mediante la siembra de células uroteliales de lavado vesical sobre una matriz SIS, permitió la reparación uretral en el modelo experimental de hipospadias proximal en conejos, y presentó resultados superiores a la reparación uretral únicamente con la matriz SIS sin células.
 - 3.1. La uretroplastia mediante técnica de “Onlay”, bien sea usando tejido uretral de ingeniería tisular o la matriz de SIS aislada fue inocua para los conejos.
 - 3.2. La uretroplastia del modelo de hipospadias en conejos con tejido uretral de ingeniería tisular a modo “Onlay” permitió la reparación completa de la uretra en un 50% de los casos tratados, con el otro 50% presentado una pequeña fístula, presentando el pene

en todos los casos un aspecto macroscópico muy similar a un pene normal, sin desviaciones ni curvaturas.

- 3.3. El estudio radiológico de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular mediante uretrocistografía demostró un buen calibre de la uretra, en todos los casos, con ausencia fístulas en el 50% y presencia de fístulas discretas en el otro 50%.
- 3.4. El estudio microscópico de la uretra tras la uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular demostró una estructura histológica similar a la uretra nativa, con un epitelio urotelial estratificado sobre una submucosa vascularizada, con ausencia de metaplasia, fibrosis, inflamación o atipia celular en la zona reparada y adyacente. El estudio inmunohistoquímico reveló la existencia de moléculas específicas del tejido urotelial en la zona reparada en proporciones y disposiciones similares al tejido uretral nativo.
- 3.5. La uretroplastia con el tejido uretral de ingeniería tisular a modo de "Onlay" del modelo de hipospadias en conejos presentó resultados macroscópicos, radiológicos y microscópicos superiores al uso de de la matriz de SIS aislada sin células para la uretroplastia de manera estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Partin AW, Peters CA, Kavoussi LR, Dmochowski RR, Wein AJ. Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition Review E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020.
2. Elliott CS, Halpern MS, Paik J, Maldonado Y, Shortliffe LD. Epidemiologic trends in penile anomalies and hypospadias in the state of California, 1985-2006. *J Pediatr Urol.* 2011;7(3):294-8.
3. Springer A, van den Heijkant M, Baumann S. Worldwide prevalence of hypospadias. *J Pediatr Urol.* 2016;12(3):152 e1-7.
4. Subramaniam R, Spinoit AF, Hoebeke P. Hypospadias repair: an overview of the actual techniques. *Semin Plast Surg.* 2011;25(3):206-12.
5. Hinman F J, Baskin L S. Hinman's Atlas of Pediatric Urologic Surgery. Second edition, 653–61 p. Philadelphia, PA, USA. Saunders (2012).
6. Borer J G RAB. Campbell-Walsh Urology. 9th ed ed. Philadelphia, Pa, USA: Saunders; 2007
7. Kraft KH, Shukla AR, Canning DA. Hypospadias. *Urol Clin North Am.* 2010;37(2):167-81.
8. Baskin LS, Ebbers MB. Hypospadias: anatomy, etiology, and technique. *J Pediatr Surg.* 2006;41(3):463-72.
9. Hayashi Y, Kojima Y. Current concepts in hypospadias surgery. *Int J Urol.* 2008;15(8):651-64.
10. De Kemp V, De Graaf P, Fledderus JO, Ruud Bosch JL, de Kort LM. Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature. *PLoS One.* 2015;10(2):e0118653.
11. Atala A, Danilevskiy M, Lyundup A, Glybochko P, Butnaru D, Vinarov A, et al. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(1):3-19.
12. Chan YY, Bury MI, Yura EM, Hofer MD, Cheng EY, Sharma AK. The current state of tissue engineering in the management of hypospadias. *Nat Rev Urol.* 2020;17(3):162-75.
13. Sievert KD, Bakircioglu ME, Nunes L, Tu R, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *J Urol.* 2000;163(6):1958-65.
14. El-Kassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, Atala A. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol.* 2003;169(1):170-3; discussion 3.
15. Kanatani I, Kanematsu A, Inatsugu Y, Imamura M, Negoro H, Ito N, et al. Fabrication of an optimal urethral graft using collagen-sponge tubes reinforced with Copoly(L-lactide/epsilon-caprolactone) fabric. *Tissue Eng.* 2007;13(12):2933-40.
16. El-Kassaby A, AbouShwareb T, Atala A. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *J Urol.* 2008;179(4):1432-6.
17. Palminteri E, Berdondini E, Fusco F, De Nunzio C, Salonia A. Long-term results of small intestinal submucosa graft in bulbar urethral reconstruction. *Urology.* 2012;79(3):695-701.
18. Orabi H, AbouShwareb T, Zhang Y, Yoo JJ, Atala A. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study. *Eur Urol.* 2013;63(3):531-8.
19. Fu Q, Cao YL. Tissue engineering and stem cell application of urethroplasty: from bench to bedside. *Urology.* 2012;79(2):246-53.
20. De Filippo RE, Kornitzer BS, Yoo JJ, Atala A. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(3):257-64.

21. Fossum M, Gustafson CJ, Nordenskjold A, Kratz G. Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washings of adult patients and children. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003;37(1):41-5.
22. Fossum M, Lundberg F, Holmberg K, Schoumans J, Kratz G, Nordenskjold A. Long-term culture of human urothelial cells--a qualitative analysis. *Cells Tissues Organs.* 2005;181(1):11-22.
23. Nagele U, Maurer S, Feil G, Bock C, Krug J, Sievert KD, et al. In vitro investigations of tissue-engineered multilayered urothelium established from bladder washings. *Eur Urol.* 2008;54(6):1414-22.
24. Fossum M, Svensson J, Kratz G, Nordenskjold A. Autologous in vitro cultured urothelium in hypospadias repair. *J Pediatr Urol.* 2007;3(1):10-8.
25. Fossum M, Skikuniene J, Orrego A, Nordenskjold A. Prepubertal follow-up after hypospadias repair with autologous in vitro cultured urothelial cells. *Acta Paediatr.* 2012;101(7):755-60.
26. Mangir N, Wilson KJ, Osman NI, Chapple CR. Current state of urethral tissue engineering. *Curr Opin Urol.* 2019;29(4):385-93.
27. Baskin LS, Erol A, Li YW, Cunha GR. Anatomical studies of hypospadias. *J Urol.* 1998 Sep;160(3 Pt 2):1108-15; discussion 1137.
28. Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics.* 1997 Nov;100(5):831-4.
29. Bergman JE, Loane M, Vrijheid M, Pierini A, Nijman RJ, Addor MC, Barisic I, Béres J, Braz P, Budd J, Delaney V, Gatt M, Khoshnood B, Klungsoyr K, Martos C, Mullaney C, Nelen V, Neville AJ, O'Mahony M, Queisser-Luft A, Randrianaivo H, Rissmann A, Rounding C, Tucker D, Wellesley D, Zymak-Zakutnia N, Bakker MK, de Walle HE. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry-based study. *World J Urol.* 2015 Dec;33(12):2159-67.
30. Baskin LS, Himes K, Colborn T. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? *Environ Health Perspect.* 2001 Nov;109(11):1175-83.
31. Giordano F, Abballe A, De Felip E, di Domenico A, Ferro F, Grammatico P, Ingelido AM, Marra V, Marrocco G, Vallasciani S, Figà-Talamanca I. Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Apr;88(4):241-50.
32. Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev.* 2015;9(5):239-259.
33. Yinon Y, Kingdom JC, Proctor LK, Kelly EN, Salle JL, Wherrett D, Keating S, Nevo O, Chitayat D. Hypospadias in males with intrauterine growth restriction due to placental insufficiency: the placental role in the embryogenesis of male external genitalia. *Am J Med Genet A.* 2010 Jan;152A(1):75-83.
34. Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, Westergaard T, Christensen K, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008 Feb 1;167(3):251-6. doi: 10.1093/aje/kwm317. Epub 2007 Nov 27. PMID: 18042671.
35. Carmichael SL, Ma C, Choudhry S, Lammer EJ, Witte JS, Shaw GM. Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J Urol.* 2013 Nov;190(5):1884-92.
36. Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod.* 2015 Mar;30(3):499-506.
37. Shih EM, Graham JM Jr. Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias. *Eur J Med Genet.* 2014 Aug;57(8):453-63.
38. Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW. *Adult and Pediatric Urology.* 3rd ed. St Louis, MO, USA Mosby; 1996. p 2549–2590

39. Hadidi AT, Azmy AF. Hypospadias Surgery an Illustrated Guide. Verlag, Berlin: Springer; 2004.
40. Snodgrass W, Macedo A, Hoebeke P, Mouriquand PD. Hypospadias dilemmas: a round table. *J Pediatr Urol.* 2011 Apr;7(2):145-57.
41. Van der Horst HJ, de Wall LL. Hypospadias, all there is to know. *Eur J Pediatr.* 2017 Apr;176(4):435-441. doi: 10.1007/s00431-017-2864-5. Epub 2017 Feb 11. Erratum in: *Eur J Pediatr.* 2017 Oct;176(10):1443.
42. Hadidi AT. History of hypospadias: Lost in translation. *J Pediatr Surg.* 2017 Feb;52(2):211-217.
43. Subramaniam R, Spinoit AF, Hoebeke P. Hypospadias repair: an overview of the actual techniques. *Semin Plast Surg.* 2011 Aug;25(3):206-12.
44. Duckett JW. MAGPI (meatoplasty and glanuloplasty): a procedure for subcoronal hypospadias. *Urol Clin North Am.* 1981 Oct;8(3):513-9.
45. Snodgrass W. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. *J Urol.* 1994 Feb;151(2):464-5.
46. Hayes MC, Malone PS. The use of a dorsal buccal mucosal graft with urethral plate incision (Snodgrass) for hypospadias salvage. *BJU Int.* 1999 Mar;83(4):508-9.
47. Duckett JW Jr. Transverse preputial island flap technique for repair of severe hypospadias. *Urol Clin North Am.* 1980 Jun;7(2):423-30.
48. Elder JS, Duckett JW, Snyder HM. Onlay island flap in the repair of mid and distal penile hypospadias without chordee. *J Urol.* 1987 Aug;138(2):376-9. doi: 10.1016/s0022-5347(17)43152-1. PMID: 3599258.
49. Emir H, Jayanthi VR, Nitahara K, Danismend N, Koff SA. Modification of the Koyanagi technique for the single stage repair of proximal hypospadias. *J Urol.* 2000 Sep;164(3 Pt 2):973-5; discussion 976.
50. Bracka A. Hypospadias repair: the two-stage alternative. *Br J Urol.* 1995 Dec;76 Suppl 3:31-41.
51. Thomas D, Duffy P, Rickwood A. *Essentials of Paediatric Urology.* 2nd Ed. London, UK: Informa; 2008.
52. Pfistermuller KL, McArdle AJ, Cuckow PM. Meta-analysis of complication rates of the tubularized incised plate (TIP) repair. *J Pediatr Urol.* 2015 Apr;11(2):54-9.
53. Duckett JW, Snyder HM 3rd. Meatal advancement and glanuloplasty hypospadias repair after 1,000 cases: avoidance of meatal stenosis and regression. *J Urol.* 1992 Mar;147(3):665-9.
54. Wilkinson DJ, Farrelly P, Kenny SE. Outcomes in distal hypospadias: a systematic review of the Mathieu and tubularized incised plate repairs. *J Pediatr Urol.* 2012 Jun;8(3):307-12.
55. Wang C, Zhang W, Song H. Recurrent Ventral Curvature with Long-Term Follow-up after Transverse Preputial Island Urethroplasty. *Eur J Pediatr Surg.* 2020 Oct;30(5):429-433.
56. Bracka A. Hypospadias repair: the two-stage alternative. *Br J Urol.* 1995 Dec;76 Suppl 3:31-41.
57. Altarac S, Papeš D, Bracka A. Two-stage hypospadias repair with inner preputial layer Wolfe graft (Aivar Bracka repair). *BJU Int.* 2012 Aug;110(3):460-73.
58. Lowe JS, Anderson PG, Anderson SI. *Stevens & Lowe's Human Histology.* Chapter 16: Male Reproductive System, Fifth Edition. E-Book. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Health Sciences; 2020
59. Skonieczna J, Madej JP, Kaczmarek-Pawelska A, Będziński R. Histological and morphometric evaluation of the urethra and penis in male New Zealand White rabbits. *Anat Histol Embryol.* 2021 Jan;50(1):136-143.
60. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat.* 2008 Jul;213(1):66-72.

61. Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: advances from bench to patients. *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 24;2013:154564.
62. Versteegden LRM, de Jonge PKJD, IntHout J, van Kuppevelt TH, Oosterwijk E, Feitz WFJ, de Vries RBM, Daamen WF. Tissue Engineering of the Urethra: A Systematic Review and Meta-analysis of Preclinical and Clinical Studies. *Eur Urol*. 2017 Oct;72(4):594-606. doi: 10.1016/j.eururo.2017.03.026. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28385451.
63. Versteegden LR, van Kampen KA, Janke HP, Tiemessen DM, Hoogenkamp HR, Hafmans TG, Roozen EA, Lomme RM, van Goor H, Oosterwijk E, Feitz WF, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Tubular collagen scaffolds with radial elasticity for hollow organ regeneration. *Acta Biomater*. 2017 Apr 1;52:1-8.
64. Pinnagoda K, Larsson HM, Vythilingam G, Vardar E, Engelhardt EM, Thambidorai RC, Hubbell JA, Frey P. Engineered acellular collagen scaffold for endogenous cell guidance, a novel approach in urethral regeneration. *Acta Biomater*. 2016 Oct 1;43:208-217.
65. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(3):401-16.
66. Sack BS, Mauney JR, Estrada CR Jr. Silk Fibroin Scaffolds for Urologic Tissue Engineering. *Curr Urol Rep*. 2016 Feb;17(2):16.
67. Chung YG, Tu D, Franck D, Gil ES, Algarrahi K, Adam RM, Kaplan DL, Estrada CR Jr, Mauney JR. Acellular bi-layer silk fibroin scaffolds support tissue regeneration in a rabbit model of onlay urethroplasty. *PLoS One*. 2014 Mar 14;9(3):e91592.
68. Nuininga JE, van Moerkerk H, Hanssen A, *et al*. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *Eur Urol*, 2003,44(2):266–271.
69. Kawano PR, Fugita OE, Yamamoto HA, *et al*. Comparative study between porcine small intestinal submucosa and buccal mucosa in a partial urethra substitution in rabbits. *J Endourol*, 2012,26(5):427–432.
70. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, *et al*. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology*, 1998,52(1):138–142.
71. 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):1132–1135.
72. Mantovani F, Trinchieri A, Castelnuovo C, *et al*. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix. *Eur Urol*, 2003,44(5):600–602.
73. Fiala R, Vidlar A, Vrtal R, *et al*. Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures. *Eur Urol*, 2007,51(6):1702–1708.
74. Palminteri E, Berdondini E, Colombo F, *et al*. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short-term results. *Eur Urol*, 2007,51(6):1695–1701
75. Le Roux PJ. Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: a pilot study. *J Urol*, 2005,173(1):140–143.
76. Hauser S, Bastian PJ, Fechner G, *et al*. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in a consecutive series. *Urology*, 2006,68(2):263–266.
77. Li C, Xu YM, Song LJ, Fu Q, Cui L, Yin S. Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts. *J Urol*. 2008;180(4):1538-42.
78. Wang YQ, Li YQ, Liu LQ, Xu JJ, Huo R, Li Q, Li SK. [Rabbit urethral defect repair with freeze-dried acellular bladder submucosa]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2005 Jan;21(1):62-5. Chinese..
79. Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol*, 1999,162(3 Pt 2):1148–1151.
80. Bhargava S, Patterson JM, Inman RD, MacNeil S, Chapple CR. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes. *Eur Urol*. 2008;53(6):1263-9.

81. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol.* 2002;168(4 Pt 2):1789-92; discussion 92-3.
82. Zou Q, Fu Q. Tissue engineering for urinary tract reconstruction and repair: Progress and prospect in China. *Asian J Urol.* 2018 Apr;5(2):57-68.
83. Sharma AK, Cheng EY. Growth factor and small molecule influence on urological tissue regeneration utilizing cell seeded scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Mar;82-83:86-92.
84. Davis NF, Cunnane EM, Quinlan MR, Mulvihill JJ, Lawrentschuk N, Bolton DM, Walsh MT. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1107:189-198. doi: 10.1007/5584_2017_139. PMID: 29340876.
85. Panda A. Stem cell in urology-are we at the cusp of a new era? *Transl Androl Urol.* 2018 Aug;7(4):653-658.
86. Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018 Feb;24(1):1-24.
87. Mikami H, Kuwahara G, Nakamura N, Yamato M, Tanaka M, Kodama S. Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells. *J Urol.* 2012 May;187(5):1882-9.
88. Xie M, Xu Y, Song L, Wang J, Lv X, Zhang Y. Tissue-engineered buccal mucosa using silk fibroin matrices for urethral reconstruction in a canine model. *J Surg Res.* 2014 May 1;188(1):1-7.
89. Wang F, Liu T, Yang L, Zhang G, Liu H, Yi X, Yang X, Lin TY, Qin W, Yuan J. Urethral reconstruction with tissue-engineered human amniotic scaffold in rabbit urethral injury models. *Med Sci Monit.* 2014 Nov 26;20:2430-8.
90. Liu Y, Ma W, Liu B, Wang Y, Chu J, Xiong G, Shen L, Long C, Lin T, He D, Butnaru D, Alexey L, Zhang Y, Zhang D, Wei G. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Mar 9;8(1):63.
91. Liu JS, Bury MI, Fuller NJ, Sturm RM, Ahmad N, Sharma AK. Bone Marrow Stem/Progenitor Cells Attenuate the Inflammatory Milieu Following Substitution Urethroplasty. *Sci Rep.* 2016 Oct 20;6:35638.
92. Wang Y, Fu Q, Zhao RY, Deng CL. Muscular tubes of urethra engineered from adipose-derived stem cells and polyglycolic acid mesh in a bioreactor. *Biotechnol Lett.* 2014 Sep;36(9):1909-16.
93. Wang DJ, Li MY, Huang WT, Lu MH, Hu C, Li K, Qiu JG, Gao X. Repair of urethral defects with polylactid acid fibrous membrane seeded with adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Connect Tissue Res.* 2015 Nov;56(6):434-9.
94. Gong EM, Cheng EY. Current challenges with proximal hypospadias: We have a long way to go. *J Pediatr Urol.* 2017 Oct;13(5):457-467.
95. Ozgel O, Dursun N, Cengelci A, Ates S. Arterial supply of the penis in the New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Anat Histol Embryol.* 2003;32(1):6-8.
96. Maia RS, Babinski MA, Figueiredo MA, Chagas MA, Costa WS, Sampaio FJ. Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int J Imp Res.* 2006;18:121-5.
97. Abidu-Figueiredo M, Costa WS, Chagas MA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Age-related changes in the concentration of elastic fibers in different regions of the rabbit penis. *Acta Cir Bras.* 2013;28(5):378-384.
98. Wu BJ, Jiang H, Li WP, Zhang YF, Chen G. [Morphologic observation of the regenerated nerve in reconstructed penis with sensory nerve implantation in rabbit]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2007 Sep;23(5):416-9. Chinese.
99. Bhat A, Bhat M, Kumar V, Kumar R, Mittal R, Saksena G. Comparison of variables affecting the surgical outcomes of tubularized incised plate urethroplasty in adult and pediatric hypospadias. *J Pediatr Urol.* 2016;12(2):108 e1-7.

100. Shi L, Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *Int J Burns Trauma*. 2013;3(4):173-9.
101. Nie X, Xiao D, Wang W, Song Z, Yang Z, Chen Y, et al. Comparison of Porcine Small Intestinal Submucosa versus Polypropylene in Open Inguinal Hernia Repair: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135073.
102. Mosala Nezhad Z, Poncelet A, de Kerchove L, Gianello P, Fervaille C, El Khoury G. Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix(R)) in cardiovascular surgery: a systematic review. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;22(6):839-50.
103. Sayedahmed K, Rosenhammer B, Spachmann PJ, Burger M, Aragona M, Kaftan BT, et al. Bicentric prospective evaluation of corporoplasty with porcine small intestinal submucosa (SIS) in patients with severe Peyronie's disease. *World J Urol*. 2017;35(7):1119-24.
104. Qi N, Li WJ, Tian H. A systematic review of animal and clinical studies on the use of scaffolds for urethral repair. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2016;36(1):111-7.
105. Xue JD, Gao J, Fu Q, Feng C, Xie H. Seeding cell approach for tissue-engineered urethral reconstruction in animal study: A systematic review and meta-analysis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(13):1416-28.
106. Dorin RP, Pohl HG, De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? *World J Urol*. 2008 Aug;26(4):323-6.
107. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011;377(9772):1175-82.
108. Osman NI, Patterson JM, MacNeil S, Chapple CR. Long-term follow-up after tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty. *Eur Urol*. 2014;66(4):790-1.
109. Ram-Liebig G, Barbagli G, Heidenreich A, Fahlenkamp D, Romano G, Rebmann U, et al. Results of Use of Tissue-Engineered Autologous Oral Mucosa Graft for Urethral Reconstruction: A Multicenter, Prospective, Observational Trial. *EBioMedicine*. 2017;23:185-92.
110. Debels H, Hamdi M, Abberton K, Morrison W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015;3(1):e284.