

# Risultati preliminari sull'impiego di colture cellulari autologhe di mucosa buccale nelle ricostruzioni uretrali

Enzo Palminteri<sup>1</sup>, Elisa Berdondini<sup>1</sup>, Serena Maruccia<sup>2</sup>, Lorenzo Larocca<sup>3</sup>, Luca Iannotta<sup>4</sup>, Giorgio Franco<sup>4</sup>, Vincenzo Gentile<sup>4</sup>, Simona Ceccarelli<sup>5</sup>, Cinzia Marchese<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro di Chirurgia Uretrale e Genitale, Arezzo - Italy

<sup>2</sup>AO Desio e Vimercate PO Vimercate - Italy

<sup>3</sup>UO di Urologia, Ospedale di Martinafranca - Italy

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università Sapienza, Roma - Italy

<sup>5</sup>Dipartimento di Urologia "U. Bracci", Università Sapienza, Roma - Italy

---

## **Preliminary results on the use of autologous cell culture grafts of buccal mucosa in urethral repairs**

**OBJECTIVE:** *We present our preliminary experience with the use of autologous cell cultures of buccal mucosa (BM) in urethral repair.*

**PATIENTS AND METHODS:** *Five patients with urethral stenosis underwent staged urethral reconstruction with MB autologous cell culture grafts.*

*MB biopsies were obtained from each patient. Keratinocytes and fibroblasts were isolated. This cellular suspension was seeded into Petri dishes. The cultures were kept in chemically specific ground for keratinocyte cultures. Once they reached the proper confluence and extension for urethral reconstruction, the cultures were transplanted in the patients.*

*During the first stage of surgery, after the removal of healing tissues, the MB culture grafts were transplanted in order to recreate a neo-urethral plate. Six months later, the neo-urethral plate was re-tubularized.*

**RESULTS:** *Average follow-up was 24 mo. We reported successful staged reconstruction in 2 cases (40%). Three cases (60%) were unsuccessful. One patient developed a scar retraction of the grafts after the first stage of surgery, which prevented broad urethral reconstruction. Two patients who had completed the staged reconstructive process, developed a re-stenosis.*

*There were no reported graft site infections and none of the grafts was rejected.*

**CONCLUSIONS:** *We report the procedure in order to obtain and use an MB homologous cell culture. Using autologous material reduced the surgical time and wiped out the risk of rejection; on the other hand, the tissue was so thin and with no adequate scaffold that the healing retraction of the graft was increased, thus compromising the urethral reconstruction. Preliminary results confirm that bio-engineering applied to urethral surgery is far from obtaining adequate tissue with reference to extension, thickness and biological features.*

**KEY WORDS:** *Urethra, Urethral stenosis, Cell cultures, Buccalmucosa*

---

**PAROLE CHIAVE:** *Uretra, Stenosi Uretra, Colture cellulari, Mucosa buccale*

*Accepted: March, 15, 2012*

## INTRODUZIONE

Nella chirurgia ricostruttiva dell'uretra sono stati impiegati negli anni diversi tessuti di sostituzione tra cui la cute genitale ed extragenitale, la mucosa vescicale e la mucosa buccale (MB). La cute prepuziale è impiegata frequentemente, ma il suo prelievo può essere causa di complicanze estetiche peniene. Inoltre il suo impiego può essere controindicato nei casi di Lichen Sclerosus (LS) o nei pazienti circoncisi (1, 2).

Attualmente la MB è considerata il tessuto di sostituzione uretrale gold-standard grazie alla facilità di prelievo ed alle caratteristiche istologiche che lo rendono idoneo alla chirurgia riparativa dell'uretra (3, 4). Tuttavia bisogna considerare che il prelievo può essere causa potenziale di complicanze orali e, inoltre, esiste un limite alla lunghezza del tessuto che può essere prelevato.

In questi anni la ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale si è rivolta al tentativo di creare un tessuto che potesse avere le caratteristiche istologiche della mucosa buccale e dimensioni adeguate, ma senza il rischio delle complicanze legate al prelievo (5). Presentiamo la nostra esperienza preliminare con l'impiego di MB autologa nella chirurgia ricostruttiva uretrale.

## MATERIALI E METODI

Dall'Ottobre 2009 al Dicembre 2011, 5 pazienti con stenosi uretrale sono stati sottoposti a ricostruzione uretrale stadiata sec. Bracka (6) con impiego di innesti di colture cellulari autologhe di MB (Tab. I). Tutti i pazienti erano già stati sottoposti senza successo a pregressi interventi di uretroplastica e/o dilatazioni e/o uretrotomie endoscopiche.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti al prelievo biptico di un frammento di MB di circa 6 mmØ in anestesia locale. Il frammento di MB è stato sottoposto a *defatting*, lavato con PBS (Phosphate Saline Buffer -soluzione salina che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato con funzione di soluzione tampone per stabilizzare il ph cellulare) e posto in liquido antibiotico (penicillina, streptomina, gentamicina) per eliminare gli innumerevoli germi contenuti nella cavità orale. Posto in recipienti termici contenenti ghiaccio secco, il frammento è stato trasportato presso il laboratorio di Medicina Sperimentale per la successiva processazione.

Tramite dissociazione enzimatica viene eseguito un *defatting* chimico (20 minuti a 37°C con tripsina 0,25%) per isolare l'epidermide e per separare i cheratinociti dai fibroblasti

La sospensione cellulare è stata inoculata in piastre di Petri pretrattate con 5 µg/ml di collagene IV per fare aderire le cellule. Le colture sono state mantenute in terreno chimicamente definito specifico per le colture di cheratinociti, alla temperatura di 37°C e ad una concentrazione di CO<sub>2</sub> pari al 5%. Una volta raggiunta la confluenza ed un'estensione adeguata alla ricostruzione uretrale (tempo medio 15 giorni), le colture cellulari sono state staccate dalle piastre mediante enzima dispasi, lavate con PBS e adagiate su garze sterili di acido ialuronico, facendo attenzione a mantenere lo strato basale della coltura verso l'alto: è questo lo strato che dovrà prendere contatto con la superficie di appoggio creata sulla porzione denudata dei corpi cavernosi al momento della riparazione chirurgica.

Le piastre con le colture cellulari pronte per l'impianto sono state trasportate in idonei contenitori termici e trapiantate sui pazienti al momento della 1° tempo della ricostruzione stadiata.

**TABELLA 1 - CARATTERISTICHE DELLA SERIE DI PAZIENTI**

Paziente (età)	Sede stenosi	Cause stenosi	Lunghezza Stenosi (cm)	Ricostruzione uretrale stadiata con innesti di colture cellulari di MB	Risultati
1 (44)	peno-bulbare	Catetere	12	1° tempo	Fallimento: re-uretroplastica con MB
2 (48)	peno-bulbare	LS	13	1° tempo + 2° tempo	Fallimento: in attesa di reintervento
3 (32)	peniena	Ipospadi fallita	3	1° tempo + 2° tempo	Fallimento: uretrotomia peniena
4 (19)	peniena	catetere	3	1° tempo + 2° tempo	Successo
5 (56)	peniena	LS	7	1° tempo + 2° tempo	Successo

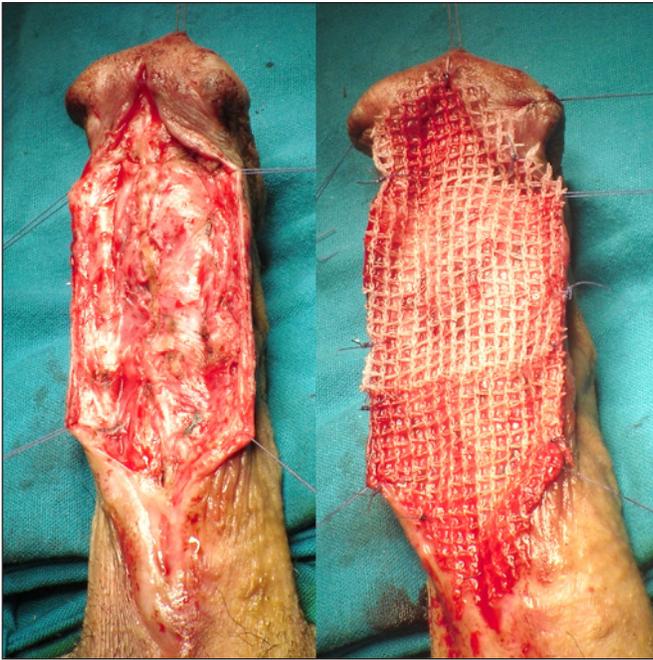


Fig. 1

### 1° Tempo della ricostruzione uretrale secondo Bracka

In anestesia generale, l'uretra stenotica peno-bulbare o peniena è stata aperta longitudino-ventralmente. L'uretra sclerotica è stata rimossa, creando uno spazio di denudazione dei corpi cavernosi dove gli innesti autologhi di colture cellulari di MB sono stati allocati e fissati allo scopo di creare un neo-piatto uretrale (Fig. 1).

La medicazione compressiva ha immobilizzato gli innesti, favorendo gli iniziali (72 ore) processi di attecchimento vascolare (fase d'imbibizione e fase d'inosculazione) in cui vengono ricreate, tramite processi neoangiogenetici, le prime connessioni vascolari.

La medicazione è stata rimossa dopo 7 gg insieme alla garza di acido ialuronico che fornisce il supporto alle colture cellulari.

### 2° tempo chirurgico di ritubularizzazione del neo-piatto uretrale

Il secondo tempo chirurgico di tubularizzazione del neo-piatto uretrale è stato eseguito almeno 6 mesi dopo la ricostruzione del neo-piatto uretrale con gli innesti di colture cellulari di MB (Fig. 2). Questo è stato possibile solo nei



Fig. 2

4 casi di buon attecchimento dell'innesto senza retrazioni cicatriziali. In un paziente (caso 1) la retrazione cicatriziale dell'innesto non ha consentito la tubularizzazione del neo-piatto uretrale (Fig. 3).

Sono stati considerati fallimento i casi che non hanno terminato l'iter ricostruttivo a causa della retrazione cicatriziale dell'innesto oppure che hanno terminato l'iter ricostruttivo ma hanno sviluppato una recidiva della stenosi che ha necessitato di ulteriori terapie.

## RISULTATI

Il follow-up medio è stato di 24 mesi (range 21-26).

In 2 (40%) casi la ricostruzione stadiata ha avuto successo: i pazienti hanno un flusso non ostruito e non necessitano di ulteriori manovre strumentali.

In 3 (60%) casi abbiamo avuto un fallimento: 1 paziente ha sviluppato una notevole retrazione cicatriziale degli innesti che ha impedito la ritubularizzazione e reso necessaria una



Fig. 3

nuova ricostruzione del piatto uretrale con innesti classici di MB. Due pazienti che avevano completato l'iter ricostruttivo hanno sviluppato una re-stenosi: 1 paziente è in attesa di essere rioperato ed 1 paziente è stato sottoposto a uretrotomia peniena.

In nessun caso, comunque, si sono verificate infezioni e fenomeni di rigetto degli innesti.

## DISCUSSIONE

Da alcuni anni l'ingegneria tissutale è rivolta a ottenere un tessuto ideale da utilizzare nel campo della chirurgia ricostruttiva uretrale. Studi recenti hanno cercato di ottenere un tessuto con le stesse caratteristiche istologiche di quello che è attualmente considerato il tessuto di sostituzione uretrale più impiegato, la MB (5).

Seguendo questo filone di ricerca, il nostro studio preliminare è stato mirato a creare un tessuto di colture cellulari autologo di MB, ottenuto cioè dalle cellule prelevate dallo stesso paziente su cui il neo-tessuto sarebbe stato successivamente impiegato.

La facilità di prelievo tramite biopsia ha ridotto la morbilità del sito donatore, mentre l'impiego di colture cellulari autologhe ha annullato il rischio di rigetto post-trapianto.

Durante la nostra esperienza abbiamo constatato alcuni vantaggi e alcuni svantaggi.

Un vantaggio è stato che l'impiego di un materiale già pronto ha ridotto i tempi chirurgici ed annullato il discomfort del prelievo orale.

Lo svantaggio è stato dovuto alla estrema sottigliezza del neo-tessuto: questo ha reso tecnicamente più difficile l'innesto e impossibile la sua applicazione negli ampliamenti uretrali ventrali dove manca un adeguato supporto meccanico al graft.

La sottigliezza dell'innesto spiega inoltre i nostri risultati: nei casi in cui è stato necessario rimuovere circonferenzialmente interi segmenti di uretra e ricreare un intero neopiatto uretrale con gli innesti suddetti abbiamo assistito ad una notevole retrazione del trapianto (caso 1). Ove sia stato possibile invece mantenere la struttura dell'uretra ed ampliarla con l'innesto, i nostri risultati preliminari hanno evidenziato un soddisfacente attecchimento dell'innesto stesso.

Nel tentativo di ovviare alla sottigliezza della coltura cellulare, durante la ricostruzione, in alcuni casi abbiamo mobilizzato il dartos lateromedialmente per creare un letto su cui appoggiare gli innesti. Questa procedura ha permesso di creare una struttura di sostegno al sottile strato di coltura cellulare. Abbiamo infatti notato una notevole retrazione dell'innesto nei primi casi in cui l'innesto era stato appoggiato direttamente sulla tunica albuginea dei corpi cavernosi senza l'interposizione del dartos stesso. Mentre, abbiamo notato una riduzione della retrazione cicatriziale nei casi in cui l'innesto era stato adagiato sul dartos mobilizzato.

Il nostro studio sottolinea pertanto la necessità che un buon tessuto costruito dall'ingegneria tissutale abbia oltre che buone caratteristiche istologiche delle colture cellulari, anche un valido "scaffold" di sostegno per le cellule (7). Attualmente la nostra ricerca si sta indirizzando verso l'identificazione di un adeguato scaffold su cui possano essere collocate le colture cellulari di cheratinociti autologhi.

Il compito futuro dell'ingegneria tissutale in questo settore sarà quello di fornire non un tessuto simile alla mucosa

uretrale ma un tessuto strutturalmente simile all'intera parete dell'uretra.

## CONCLUSIONI

Il nostro lavoro descrive la procedura per ottenere e impiegare una coltura cellulare omologa di MB confermando da una parte il vantaggio di avere un tessuto autologo già pronto al momento della ricostruzione ma dall'altra parte lo svantaggio di non avere un tessuto di sufficiente spessore e che possa mimare la struttura tridimensionale dell'uretra. I nostri risultati preliminari confermano come la bioingegneria applicata alla chirurgia uretrale sia ancora distante dall'ottenere un tessuto adeguato per quanto riguarda estensione, spessore e caratteristiche biologiche.

## RIASSUNTO

**OBIETTIVI:** Presentiamo la nostra esperienza preliminare con l'impiego di colture cellulari di MB autologa nella riparazione uretrale.

**PAZIENTI E METODI:** Cinque pazienti con stenosi uretrale sono stati sottoposti a ricostruzione uretrale stadiata con innesti di colture cellulari autologhe di MB.

Abbiamo ottenuto da ogni pz delle biopsie di MB da cui sono stati isolati i cheratinociti ed i fibroblasti. La sospensione cellulare è stata inoculata in piastre di Petri. Le colture sono state mantenute in terreno chimicamente specifico per le colture di cheratinociti. Le colture, una volta raggiunta la confluenza ed un'estensione adeguata alla ricostruzione uretrale, sono state trapiantate nei pazienti. Al momento del 1° tempo chirurgico, dopo la rimozione dei tessuti cicatriziali, l'innesto di coltura di MB è stato trapiantato per ricreare

un neo-piatto uretrale. A distanza di più di 6 mesi, il neo-piatto uretrale è stato ritubularizzato.

**RISULTATI:** Il follow-up medio è stato di 24 mesi. In 2 (40%) casi la ricostruzione stadiata ha avuto successo. In 3 (60%) casi abbiamo avuto un fallimento: 1 paziente ha sviluppato la retrazione cicatriziale degli innesti dopo il 1° tempo chirurgico che ha impedito il completamento della ricostruzione uretrale. Due pazienti che avevano completato l'iter ricostruttivo stadiato hanno sviluppato una re-stenosi. In nessun caso abbiamo avuto infezioni o rigetto degli innesti.

**CONCLUSIONI:** Il nostro lavoro descrive la procedura per ottenere e impiegare una coltura cellulare omologa di MB. L'impiego di un materiale già pronto e autologo ha ridotto i tempi chirurgici e annullato il rischio di rigetto, ma la eccessiva sottigliezza del neo-tessuto, privo di uno scaffold adeguato, ha favorito la retrazione cicatriziale dell'innesto compromettendo la ricostruzione uretrale. I nostri risultati preliminari confermano come la bioingegneria applicata alla chirurgia uretrale sia ancora distante dall'ottenere un tessuto adeguato per quanto riguarda estensione, spessore e caratteristiche biologiche.

### Disclaimers

*Financial support: I certify that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (e.g., employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending, are the following: None*

*Conflict of interest: none*

Indirizzo degli Autori:  
Enzo Palminteri, MD  
Centro di Chirurgia Uretrale e Genitale, Arezzo - Italy  
chirurgiauretra@libero.it  
www.chirurgiauretrale.it

## BIBLIOGRAFIA

1. Palminteri E. Videoatlante di chirurgia uretrale. Volume Chirurgia dell'Uretra Bulbare. Edizioni Atlantide Audiovisivi, 2008.
2. Andrich DE, Mundy AR. What is the best technique for urethroplasty? Eur Urol 2008; 54: 1031-41.
3. Patterson JM, Chapple CR. Surgical techniques in substitution urethroplasty using buccalmucosa for the treatment of anterior urethral strictures. Eur Urol 2008; 53: 1162-71.
4. Palminteri E, Berdondini E, Shokeir AA, Iannotta L, Gentile V, Sciarra A. Two-sided Bulbar Urethroplasty Using Dorsal Plus Ventral Oral Graft: Urinary and Sexual Outcomes of a New Technique. J Urol. 2011 May; 185(5): 1766-71. Epub 2011 Mar 21.
5. Bhargava S., Chapple C.R., Bullock A.J., Layton C. and Macneil S. Tissue-engineered buccal mucosa for substitution urethroplasty. BJU Int 2004; 93: 807-811.
6. Bracka A. Hypospadias repair: the two-stage alternative. Br J Urol 1995; 76(suppl 3): 31-41.
7. Patterson JM, Bullock AJ, MacNeil S, Chapple CR. Methods to Reduce the Contraction of Tissue-Engineered Buccal Mucosa for Use in Substitution Urethroplasty. Eur Urol 2011; 60: 856-861.