



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES  
HISTOLÓGICAS Y EXPRESIÓN DE MARCADORES  
EPITELIALES EN URETROPLASTIAS REALIZADAS CON  
INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN RATAS**

**Memoria que presenta la licenciada en Medicina y Cirugía**

**FÁTIMA MARTIN CANO para aspirar al grado de Doctor.**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Fátima Martín Cano  
D.L.: GR 3791-2011  
ISBN: 978-84-694-3608-0



**CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS Y  
EXPRESIÓN DE MARCADORES EPITELIALES EN URETROPLASTIAS  
REALIZADAS CON INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN RATAS**

Memoria que presenta La licenciada en Medicina y Cirugía

Fátima Martín Cano

para aspirar al grado de Doctor

Fdo.: Fátima Martín Cano

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Ricardo Fernández Valadés

Doctor en Medicina y Cirugía

Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance

Doctor en Medicina y Cirugía

Doctor en Ciencias Biológicas

Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. D<sup>a</sup>. Ingrid Johanna Garzón Bello

Doctora en Ingeniería Tisular

Universidad de Granada

**Departamento de Histología**

**Universidad de Granada**

**2011**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES  
HISTOLÓGICAS Y EXPRESIÓN DE MARCADORES  
EPITELIALES EN URETROPLASTIAS REALIZADAS CON  
INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN RATAS**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Investigación titulado “CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES Y MOLECULARES EN URETROPLASTIAS BASADAS EN INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN RATAS”. PI FIS (expediente P 1070619) del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico:

Caracterización histológica en uretroplastias experimentales de mucosa oral. F. Martín Cano, C. Maraños Gálvez, E. Licerías Licerías, M. García Gómez, E. Díaz Moreno, A.M. Ruiz Montes, I. Garzón Bello, R. Fernández Valadés. Actual. Med. (2010) Vol. 95/2010/nº781 Septiembre / Diciembre 2010 Pág.005 – 009.

*"Todo llega y todo pasa.  
Quédate siempre con lo bueno  
de cada persona,  
cada cosa  
y cada momento vivido. "*

*A Nico, mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A ti Ricardo, el primero, por haber sido quien me diera la oportunidad durante mi periodo de formación de colaborar en proyectos de investigación, y quien impulsara este trabajo desde el primer hasta el último momento. Por ayudarme tanto, nunca te lo agradeceré lo suficiente. Te haces querer.

A Ingrid, por tu trabajo y ayuda imprescindibles, siempre has estado ahí dispuesta a guiarme y echarme una mano ante cualquier problema. Gracias por el trato cercano y agradable que me has brindado en todo momento.

A Miguel, admiro tu perseverancia y dedicación apasionada en el trabajo, tus triunfos reflejan tu brillantez, eres para mí un referente, tanto a nivel laboral como personal.

A Conchi y Amalia, por vuestra colaboración durante todo el proceso quirúrgico, dispuestas a ayudar y facilitar el trabajo, siempre con una sonrisa.

A mis compañeras residentes, por ayudar en las intervenciones, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas, y los que nos quedan por pasar.



CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL.....	11
1.1.1. EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL.....	11
1.2. HISTOLOGÍA DE LA URETRA .....	14
1.2.1. LA URETRA FEMENINA .....	14
1.2.2. LA URETRA MASCULINA.....	15
1.3. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA .....	19
1.3.1. EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA EN MUCOSA ORAL.....	23
1.3.2. EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA EN UROTELIO .....	24
1.4. INJERTOS .....	26
1.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS INJERTOS.....	26
1.4.2. FUENTES DE TEJIDOS PARA LA RECONSTRUCCIÓN URETRAL.....	27
1.5. PATOLOGÍA URETRAL: DÓNDE USAR MUCOSA ORAL .....	29
1.5.1. PATOLOGÍAS CONGÉNITAS.....	29
1.5.2. PATOLOGÍAS ADQUIRIDAS .....	35
1.6. TECNICA DE INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN HUMANOS .....	36
1.6.1. FORMAS DE COLOCAR EL INJERTO DE MUCOSA ORAL .....	38

2. OBJETIVOS .....	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	41
3.1. MATERIAL QUIRÚRGICO .....	42
3.2. INTERVENCIÓN .....	43
3.2.1. ANESTESIA .....	43
3.2.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA .....	44
3.2.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	47
3.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS.....	48
3.3.1. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN URETRA .....	49
3.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	50
4. RESULTADOS .....	53
4.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO .....	53
4.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....	54
4.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	54
4.2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	62
4.3. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	66
5. DISCUSIÓN .....	80
6. CONCLUSIONES.....	88
7. BIBLIOGRAFÍA .....	90

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL**

La mucosa oral es una membrana mucosa húmeda que tapiza la cavidad oral y actúa como barrera entre el cuerpo y el medio externo. En la cavidad oral se pueden distinguir varias zonas anatómicas, recubiertas por mucosa con distintas funciones, entre las que se encuentran la de secreción, sensorial y de protección.

La mucosa oral está integrada por dos capas de tejidos: epitelial y conectivo, que están conectados entre sí por una membrana basal. (Ferraris y cols. 2002)

### **1.1.1. EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL.**

El epitelio de la mucosa oral está constituido fundamentalmente por dos poblaciones celulares:

- A. Población intrínseca o propia del epitelio: Formada por queratinocitos, que constituyen alrededor del 90% del total de la población celular del epitelio

de la mucosa oral. Migran desde las capas más profundas del epitelio hasta su superficie, donde se descaman, renovándose constantemente.

Los queratinocitos se disponen en el epitelio formando cuatro capas o estratos:

- Basal: Donde se localizan las células madre del epitelio.

- Espinoso: Formado por varias hileras de queratinocitos.

- Granuloso: Con dos o tres capas de células aplanadas con pequeño núcleo de cromatina densa.

- Córneo: Células planas sin núcleo, con apariencia de escama compacta.

B. Población extrínseca: Formada por células permanentes y transitorias.

- Población permanente: Constituida por melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans.

- Población transitoria: Constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos.

### **1.1.1.A. CLASIFICACIÓN DEL EPITELIO.**

#### ***1.1.1.A.1. Clasificación histológica:***

El tipo de epitelio que recubre la mucosa oral es plano estratificado en general, pero en función del grado de queratinización podemos distinguir tres variantes histológicas: (Figura 1)

a.-Ortoqueratinizado, formado por las capas basal, espinosa, granulosa y un notable estrato córneo.

b.-Paraqueratinizado, que posee características similares al ortoqueratinizado con un escaso estrato córneo, y en el que se conservan algunos núcleos celulares. Presenta gran cantidad de tonofilamentos.

c. -Epitelio no queratinizado, en el que no existe capa córnea superficial.

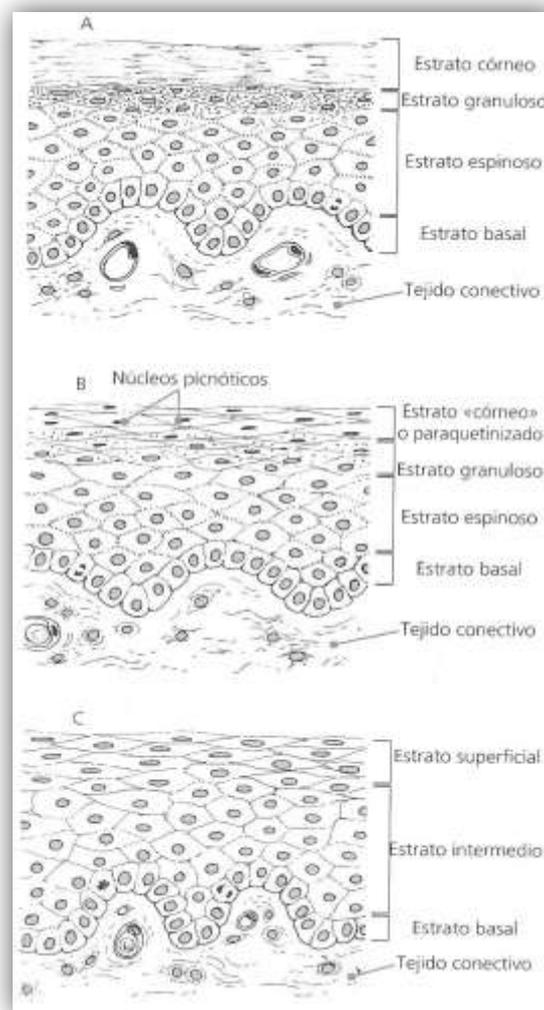


Figura 1. Esquemas con los diferentes tipos de epitelios estratificados planos  
**A.** queratinizado. **B.** paraqueratinizados. **C.** no queratinizado. Ferraris y Campos 2006.

### **1.1.1.A.2. Clasificación funcional:**

Teniendo en cuenta la función de las distintas regiones de la cavidad oral, la estructura de la mucosa varía, encontrando así tres tipos de mucosa en la boca:

- A. Mucosa masticatoria (25% de la totalidad de la mucosa oral): Reviste el paladar duro y conforma la encía. Está sometida a intensas fuerzas de fricción y presión originadas por la masticación. Tiene un epitelio plano

estratificado (que puede ser ortoqueratinizado o paraqueratinizado), y una lámina propia gruesa con densos haces de fibras colágenas; carece de fibras elásticas, ya que esta mucosa recubre solo zonas inmóviles.

- B. Mucosa de revestimiento: Es la más abundante (60%) y se encuentra en las mejillas, paladar blando, labios, suelo de la boca y en la cara ventral de la lengua. Tiene un epitelio plano estratificado no queratinizado, y su lámina propia está constituida de tejido conectivo laxo con fibras elásticas, lo que la hace ser muy flexible. Se pueden ver en su capa submucosa glándulas salivales menores (la mayoría de tipo mucosas).
- C. Mucosa especializada (15%): En el dorso de la lengua. Destaca en ella que tiene papilas linguales, que pueden ser foliadas (cara lateroposterior de la lengua), fungiformes, filiformes (en la zona anterior) y caliciformes (constituyen la V lingual). Son parte de ella también los nódulos linfáticos que constituyen la amígdala lingual.

## **1.2. HISTOLOGÍA DE LA URETRA**

La uretra es el conducto por el que discurre la orina desde la vejiga urinaria hasta el exterior del cuerpo durante la micción. La función de la uretra es excretoria en ambos sexos y también cumple una función reproductiva en el hombre al permitir el paso del semen desde las vesículas seminales, que abocan a la próstata, hasta el exterior.

### **1.2.1. LA URETRA FEMENINA**

Es distinta a la masculina pero las estructuras generales son similares.

La uretra femenina es corta, de unos 5 cm de longitud. Se extiende desde la vejiga hasta el exterior en la línea media del vestíbulo genital.

En ella se encuentran:

1. Mucosa: Epitelio de transición y en algunas zonas epitelio cilíndrico pseudoestratificado o cilíndrico estratificado pero fundamentalmente la mayor parte de la uretra femenina tiene epitelio plano estratificado.

Lámina propia: Es bastante laxa y vascularizada con gran cantidad de plexos venosos.

2. Muscular: Formada fundamentalmente por fibras musculares longitudinales, con la excepción de la parte alta próxima a la vejiga donde forma haces musculares circulares. Aunque la pared muscular uretral es la continuación del músculo liso vesical involuntario, existe un esfínter, el esfínter externo, formado por músculo estriado, de control voluntario, localizado en la porción media de la uretra, donde ésta atraviesa la musculatura estriada del suelo de la pelvis.

No existe serosa puesto que está rodeada por tejido conjuntivo muy próximo a la vagina.

### **1.2.2. LA URETRA MASCULINA**

Tiene una longitud aproximada de 18 cm y constituye las porciones terminales de los sistemas urinario y reproductor. (Figura 2)

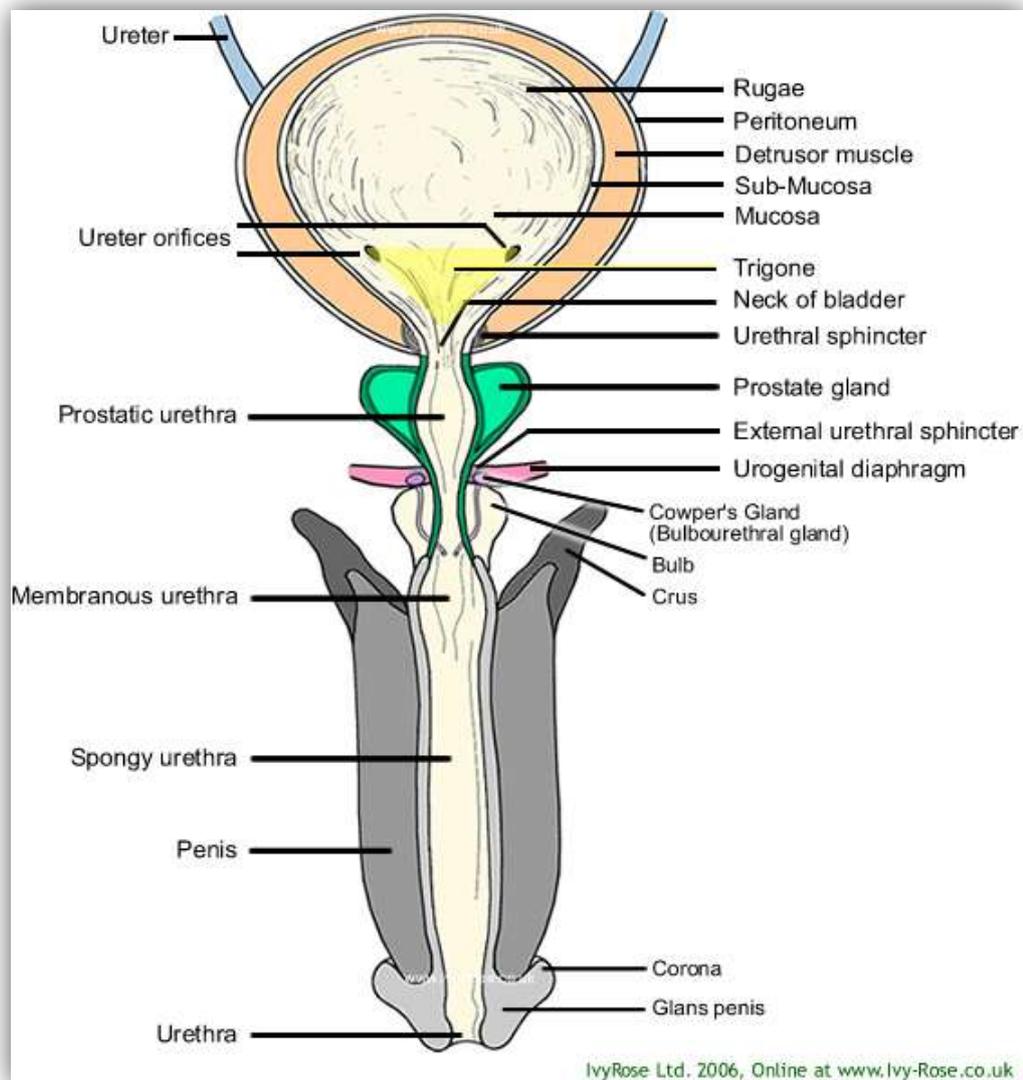


Figura 2. Uretra masculina

Se divide en 4 porciones: Uretra prostática, membranosa, bulbar y esponjosa o peneana (Fawcett 1995).

1. Uretra prostática: Tiene una longitud de alrededor de 3 cm; se extiende desde el cuello de la vejiga hasta la base de la próstata, atravesando ésta. En su pared posterior presenta una cresta longitudinal medial, la cresta uretral, sobre la que se observa una ligera elevación denominada verumontanum; en la línea media del verum se sitúa la abertura del utrículo

prostático. A cada lado del orificio se encuentran los dos conductos eyaculadores. En los surcos de la pared posterior de la uretra prostática, y a cada lado del verum, desembocan múltiples y diminutos conductos excretores de la glándula prostática. El revestimiento de la uretra en la zona proximal a los conductos eyaculadores es un epitelio transicional (Figura 3), pero distalmente a éstos se convierte en un epitelio estratificado cilíndrico que contiene células caliciformes secretoras de moco.

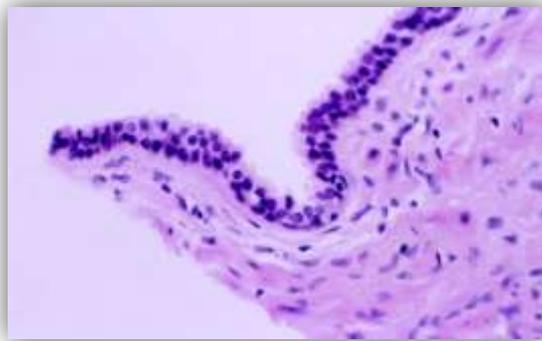


Figura 3. Epitelio de transición.

2. Uretra membranosa: Tiene una longitud aproximada de 1 a 2 cm y se extiende desde el vértice de la glándula prostática hasta el bulbo del pene. Atraviesa el diafragma urogenital (membrana perineal) del suelo de la pelvis, por detrás y por debajo de la sínfisis del pubis. El músculo estriado que rodea a la uretra en la zona del diafragma urogenital constituye el esfínter uretral externo, que es voluntario. Este segmento está revestido por un epitelio estratificado (Figura 4), o pseudoestratificado cilíndrico.



Figura 4. Epitelio estratificado

3. Uretra bulbar: Abarca desde el margen distal de la uretra membranosa hasta el ángulo penoescrotal; está envuelta por el bulbo y cuerpo esponjoso; es de mayor diámetro. Se reviste distalmente por epitelio plano que cambia gradualmente hacia epitelio de transición.
  
4. Uretra esponjosa o peneana: Tiene una longitud de entre 13 y 15 cm y atraviesa toda la longitud del pene rodeada del cuerpo esponjoso, dirigiéndose desde el diafragma urogenital hasta el orificio externo de la uretra en el glande. Está revestida por epitelio estratificado cilíndrico hasta la fosa navicular, la zona terminal y ligeramente expandida de la uretra, que está revestida por epitelio plano estratificado (Figura 5), similar al que recubre al glande. En la uretra esponjosa desembocan los conductos excretores de las glándulas bulbouretrales, que se sitúan sobre el diafragma urogenital, a ambos lados de la uretra membranosa. Sus conductos atraviesan el diafragma y por debajo del mismo se abren en el suelo de la uretra peneana. En la uretra peneana también desembocan las glándulas uretrales secretoras de moco de Littré.

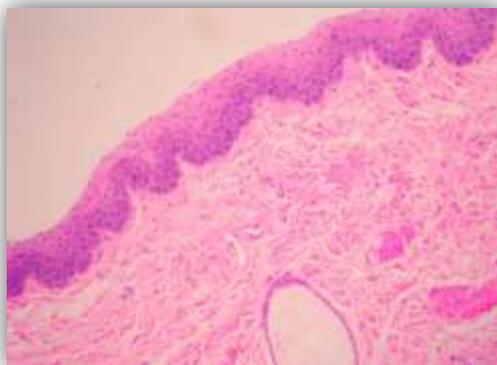


Figura 5. Epitelio plano estratificado de la uretra terminal y glande

### **1.3. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA**

La célula eucariota tiene sus proteínas estructuradas en forma de esqueleto celular, que es una formación dinámica que modifica sus características morfológicas como consecuencia de cambios estacionales medioambientales. El citoesqueleto está constituido por diferentes elementos: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios. Estos últimos, anteriormente englobados dentro del grupo de microfilamentos o considerados como productos de degradación de los microtúbulos o de los microfilamentos gruesos de miosina (Hackney 1996), se caracterizan por ser los elementos citoesqueléticos más rígidos y resistentes. Forman la periferia del núcleo y se extienden alrededor de la célula. Su misión fundamental es proporcionar resistencia mecánica a la célula, así como regular la localización de proteínas y la transmisión de señales intracelulares (Paramio y cols. 2002).

Según el tipo de célula en la que se encuentren podemos hablar de distintos tipos de filamentos intermedios. Así, encontramos los neurofilamentos (en las neuronas), gliofilamentos (en células de la glia), citoqueratinas (en células epiteliales), filamentos de desmina (en músculo liso y estriado), filamentos de vimentina (en células mesenquimales) filamentos de periferina (en neuronas que emiten axones por el sistema nervioso periférico) y láminas nucleares (Albers y cols. 1992).

Por tanto, las células epiteliales son capaces de cumplir sus funciones gracias a la expresión de estas de proteínas especializadas: Las **citoqueratinas (CK)**, que son típicas de las células epiteliales, y componen un total de 20 polipéptidos diferentes (Achtstatter y cols. 1985).

Las citoqueratinas, están codificadas por una numerosa lista de genes expresados por los distintos tipos de epitelio. Estas proteínas pueden ser encontradas en las células en diferentes combinaciones de polipéptidos tipo I, ácidos, con punto isoeléctrico (pI) menor a 5'7 y de peso molecular entre 40-60 Kd, aquí incluimos desde la CK 9 a la 20; y tipo II básicos, con pI mayor de 6, y de peso molecular entre 50-70Kd, entre estas se encuentran las CK 1 a la 8 (Sun y cols. 1980; Fuchs y cols. 1981; Tseng y cols. 1982; Heid y cols. 1988; Strelkov y cols. 2002).

Los filamentos de CK de tipo I y los de tipo II están siempre en número equivalente formando dímeros y tetrámeros. Es decir, son heteropolímeros obligados que requieren la presencia simultánea de polipéptidos de tipo I y de tipo II para la formación de filamentos (Franke y cols. 1983).

Como proteínas de filamento intermedio, las CK tienen funciones en el epitelio asociadas al citoesqueleto y a las uniones entre célula y célula (Figura 6). Su función principal es proteger a las células epiteliales del estrés mecánico (Lee y cols. 2009). Por este motivo, son necesarias para el mantenimiento de la forma celular, integridad, morfología y cohesión entre las células epiteliales; y se consideran excelentes marcadores de los diferentes patrones de diferenciación epitelial (Moll y cols. 1982). Últimas investigaciones revelan un nuevo papel de los filamentos intermedios, siendo esenciales en el crecimiento y tamaño celular por intervenir en la regulación de la síntesis proteica (Kim y cols. 2006).

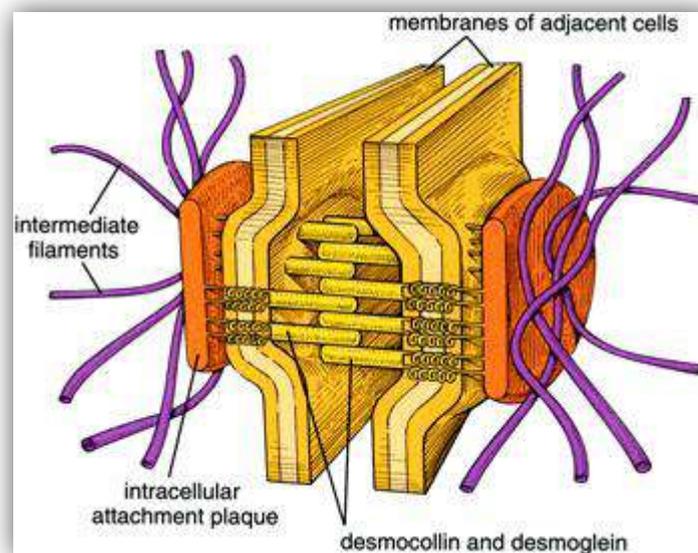


Figura 6. Estructura y localización de las proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas)

Alrededor de 20 citoqueratinas han sido descritas en todos los tipos de epitelio. Particularmente, la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas parece ser específica de cada tipo de epitelio (Raul y cols. 2004).

En general, el epitelio simple tiende a expresar CK 7, 8, 18 y 19. Los epitelios más complejos expresan las CK 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 17, 18 y 20 (D'Armento y cols. 2009). Más concretamente, el epitelio estratificado no queratinizado, expresa grandes cantidades de CK 4 y 13 en células de la capa suprabasal (Costea y cols. 2003; Sanchez-Quevedo y cols. 2007) , y CK 5 y 14 en las células de la capa basal. Finalmente, el epitelio estratificado queratinizado, expresa CK 1 y 10, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores de cornificación (Van der Velden y cols. 1999) (Figura 7).

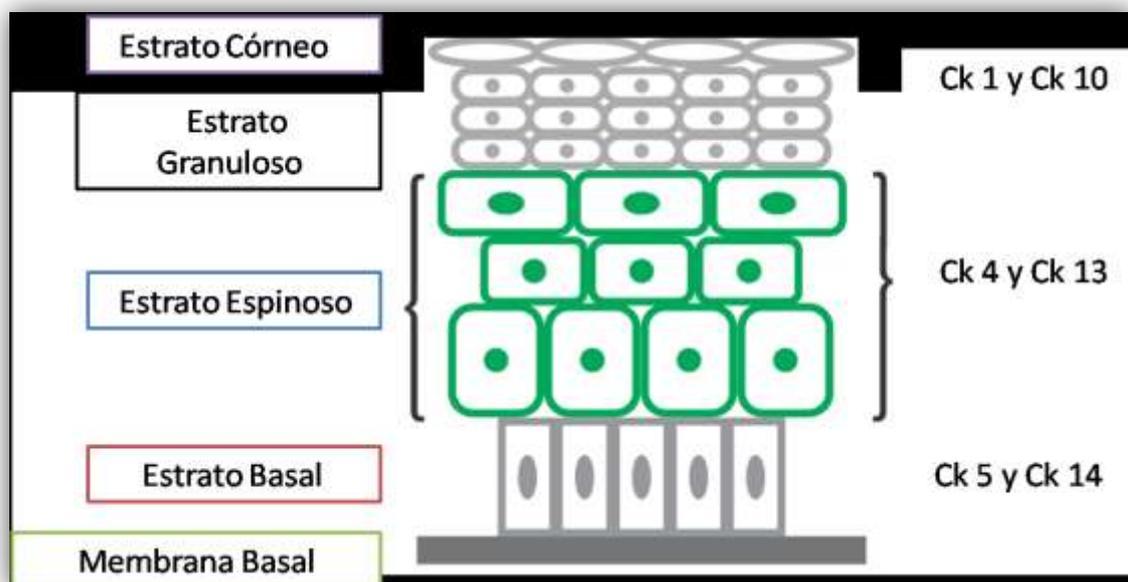


Figura 7. Distribución de la expresión de proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) en los diferentes estratos del tejido epitelial.

Las citoqueratinas están ligadas a otra proteína fundamental: **La filagrina** (HogenEsch y cols. 1999), que es una proteína estructural que interviene en las uniones desmosómicas y es barrera de protección celular frente a ciertas agresiones externas. Es una proteína epidérmica, que une los filamentos intermedios de la queratina y promueve la formación de puentes disulfuros entre los filamentos intermedios durante la diferenciación terminal de la epidermis de los mamíferos. Se sintetiza en el estrato granuloso como un precursor fosforilado llamado profilagrina, que se acumula en gránulos citoplasmáticos específicos de los queratinocitos, los gránulos de queratohialina. Durante los últimos estadios de la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos, las moléculas de profilagrina se defosforilan para convertirse en unidades funcionales de filagrina (Haydock y cols. 1990).

### **1.3.1. EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA EN MUCOSA ORAL**

La mucosa gingival del ratón presenta un epitelio queratinizado en toda su extensión, incluyendo parte del surco gingival (Montenegro y cols. 1998). En cambio la mucosa gingival humana está constituida principalmente por un epitelio paraqueratinizado, pero que en algunas zonas puede variar a ortoqueratinizado y hacia la zona del surco gingival pierde la cornificación, pasando a constituir un epitelio no queratinizado.

El epitelio que tapiza la encía humana es un epitelio estratificado escamoso que puede tener distintos grados de cornificación, variando desde el epitelio ortoqueratinizado al paraqueratinizado y no cornificado.

El epitelio oral no queratinizado que reviste la mucosa alveolar, el surco gingival, la superficie interna de labios y mejillas, el suelo de la boca, la superficie ventral y lateral de la lengua, el paladar blando y la mucosa interpapilar, expresa polipéptidos diferentes del epitelio queratinizado, donde faltan las citoqueratinas de alto peso molecular (Clausen y cols. 1986). En estos epitelios, todas las células suprabasales contienen citoqueratinas 4 y 13 (como en el esófago), pero no las de tipo epidérmico 1 - 10 y 11, mientras que la capa basal contiene queratinas 5 y 14 específicas de la estratificación (Sawaf y cols. 1991) (Figura 8).

La filagrina es un componente normal de las capas suprabasales del epitelio oral tanto de rata como de humanos (Dale y cols. 1982).

La presencia de filagrina en el estrato córneo y granuloso probablemente está relacionada con el grado de queratinización o maduración de las células epiteliales (Itoiz y cols. 1985).

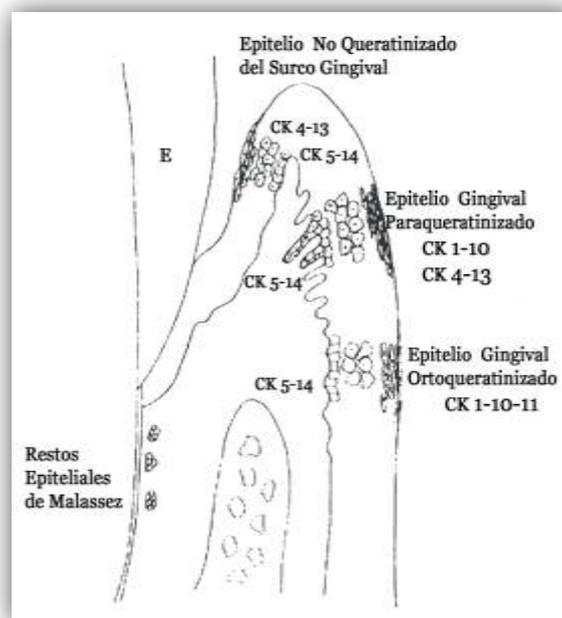


Figura 8. Distribución de citoqueratinas en el epitelio gingival de las diferentes zonas de la encía humana.

### 1.3.2. EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS Y FILAGRINA EN UROTELIO

A lo largo de todo el tracto urinario la expresión de citoqueratinas es muy variable. El epitelio que recubre las papilas renales expresa CK 7, 8, 18, 19, típicas de epitelios simples, mientras que los patrones de expresión de CK en la uretra corresponden a la transición gradual del epitelio pseudoestratificado de la uretra esponjosa, que expresa CKs 4, 5, 6, 13, 14, 15 y 19, hasta el epitelio escamoso estratificado de la fosa navicular, con expresión de CK 5, 6, 10, 11, 13, 15 y 19, y menores cantidades de 1 y 14 (Achtstatter y cols. 1985).

El urotelio normal en su capa basal expresa las CK 5, 7, 8, 13, 17, 18, 19; en las células intermedias de capa suprabasal las CK 7, 8, 13, 18, 19 y en la capa más superficial 7, 8, 18, 19, 20. Existe alguna expresión de CK 4, pero su localización es difusa (Southgate y cols. 1999).

Los patrones de expresión de citoqueratinas de epitelio uretral in vivo e in vitro son similares para la expresión de CK 7, 18 y 19 (características de los epitelios

simples) y CK 13 (característica de los epitelios estratificados no queratinizados). El urotelio cultivado también expresa CK 14 (característica de epitelio estratificado queratinizado) en aproximadamente el 25% de las células y CK 16 (característica de las células de crecimiento rápido) (Petzoldt y cols. 1994).

Dado que la filagrina está presente en los epitelios queratinizados, en el urotelio no se encuentra expresión de dicha proteína.

## **1.4. INJERTOS**

El término injerto implica que el tejido ha sido extirpado de una ubicación y transferido a un lecho huésped, en el cual se desarrolla una nueva irrigación sanguínea. Para todos los injertos libres un sitio receptor bien vascularizado es imprescindible para una óptima supervivencia del mismo (Fawcett 1995).

Desde que el injerto es colocado en el lecho receptor, y hasta que está integrado en él, pasa una serie de fases de adaptación del tejido a su nueva ubicación. La fase inicial, llamada imbibición, depende de la difusión de nutrientes desde el lecho huésped adyacente hacia el injerto y requiere aproximadamente 48 horas. Es seguida por una segunda fase, la biointegración, que es la formación de vascularización nueva y permanente en el injerto y también requiere 48 horas. Una vez acontecidas estas dos fases, aproximadamente al 5º día se puede observar el injerto prendido o no.

### **1.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS INJERTOS**

1. Según su procedencia:

Autoinjerto: del mismo individuo.

Isoinjerto: de gemelo univitelino.

Homoinjerto o Alloinjerto: de la misma especie.

Heteroinjerto o Xenoinjerto: de distinta especie.

2. Según su composición:

Mucosos.

Cutáneos (epidérmicos y dérmicos).

Fascia y tejido celular subcutáneo.

Tendinosos.

Nerviosos.

Vasculares.

Oseos y cartilagosos.

#### **1.4.2. FUENTES DE TEJIDOS PARA LA RECONSTRUCCIÓN URETRAL.**

La formación de la neouretra implica la transferencia de tejido, es decir, movimiento de tejidos cercanos o distales para lograr la reconstrucción. Las técnicas de uretroplastia involucran el campo de tejido adyacente inmediato, colgajos de tejido local, injertos libres de tejido genital o extragenital o una combinación de éstos ( Figura 9).

Para llevar a cabo la reconstrucción uretral se han utilizado autoinjertos de diversos tejidos, entre ellos vena, piel, mucosa oral y mucosa vesical. La búsqueda de un lugar donante ideal para la realización de uretroplastias ha sido siempre un desafío. Al principio, los injertos de piel total de zonas no pilosas mostraron resultados prometedores. Sin embargo, estos injertos se asociaban con complicaciones como estenosis recidivantes, balanitis xerótica obliterante, liquen escleroso, crecimiento de pelos intrauretrales y retracción del injerto. Los injertos de piel parcial demostraron una reducción en la tendencia a la retracción pero tienen menor fuerza y resistencia. La mucosa vesical ha sido también utilizada, pero asocia complicaciones de la zona receptora, como son prolapso de mucosa y estenosis del meato, de difícil recuperación (Watanabe y cols. 1995). Además, debido a la baja incisión abdominal requerida para el acceso de la zona donante, el proceso es técnicamente complejo, y a menudo tiene consecuencias estéticas malas y retraso en la cicatrización de la herida de la zona donante (Markiewicz y cols. 2007).

Los tejidos utilizados en la reconstrucción uretral son:

**-Tejido adyacente inmediato:** La neouretra puede formarse por reconfiguración del tejido inmediatamente yuxtapuesto al meato hipospádico o a lo largo del camino de la uretroplastia propuesta. Esta forma de uretroplastia puede ser la de menor riesgo y la menos complicada desde el punto de vista técnico. (Ejemplo: tubulización simple de la placa uretral).

**-Colgajos de tejido local:** Se puede transferir tejido peniano local específico u otro tejido genital a la parte ventral del pene para ser utilizado en la uretroplastia o algún otro componente de la reparación del hipospadias. El término colgajo implica que el tejido utilizado se extrae y se transfiere con preservación o restablecimiento quirúrgico de su vasculatura en el sitio receptor. Los colgajos de tejido local utilizados para la reconstrucción uretral deben ser finos, no hirsutos y deben poder adaptarse de manera confiable (Fawcett 1995). Estos colgajos se denominan colgajos fasciculocutáneos y el sistema de la fascia extendida se denomina fascia del dartos. Los vasos del colgajo fasciculocutáneo se preservan dentro de la fascia, que provee un conducto para arterias y venas pequeñas. La irrigación sanguínea y el drenaje venoso axial se realizan a través de ramas de los vasos pudendos externos superficiales y profundos, que son ramas mediales de los vasos femorales.

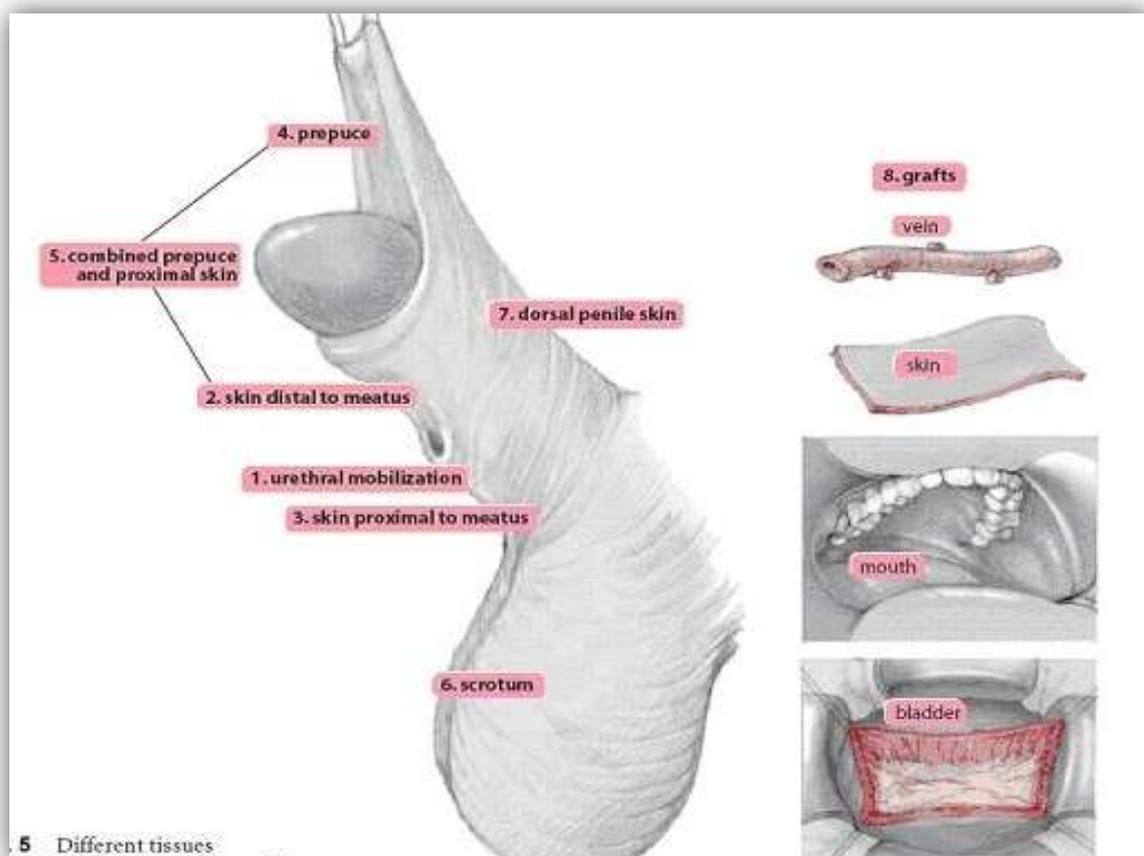


Figura 9. Tejidos utilizados en la reconstrucción uretral

**-Injertos libres locales o extragenitales:** Cuando no es posible utilizar tejido circundante por ser insuficiente o por verse comprometida su vascularización, es necesario usar injertos (Kropfl y cols. 1998).

El uso de mucosa oral como zona donante de injerto para uretroplastia consiste en un trasplante autólogo de mucosa oral no queratinizada, a la uretra para su uso en la reparación de una gran variedad de defectos uretrales.

Los lugares más frecuentes usados como zona donante son la mucosa de la cara interna de la mejilla y la región alveolar mandibular labial. Ambas zonas, ya sean de mejilla o de labio se consideran injertos de mucosa oral.

Durante años la mucosa oral se ha usado en la reconstrucción de defectos orales y maxilofaciales (Donoff 1976), reparaciones conjuntivales en oftalmología (Leone 1995), cirugía reconstructiva faríngea (Yarrington 1980) y corrección de defectos vaginales (Lin y cols. 2003).

## **1.5. PATOLOGÍA URETRAL: DÓNDE USAR MUCOSA ORAL**

La uretra puede presentar alteraciones desde el momento del nacimiento, formando parte de las patologías congénitas, o bien ser adquiridas a lo largo de la vida. En todos los casos puede precisarse cirugía reconstructiva. A continuación se describen las distintas anomalías uretrales que se pueden encontrar en la clínica diaria.

### **1.5.1. PATOLOGÍAS CONGÉNITAS**

- **Hipospadias:** Es la abertura anormal de la uretra en la cara ventral del pene, por fusión incompleta de los pliegues uretrales (Figura 10). La uretra puede desembocar a nivel del glande, cuerpo del pene, su base, o en zona escrotal o perineal. Cuando falta por completo la fusión de los pliegues uretrales, se forma una hendidura sagital de gran tamaño que corre a lo largo del pene y del escroto. En estos casos, las eminencias escrotales se asemejan a los labios mayores de la mujer. La incidencia del hipospadias es de 5 de cada 1000 nacimientos.



Figura 10. Hipospadias

El hipospadias es un defecto congénito del pene que asocia tres anomalías en la anatomía y desarrollo del mismo (Figura 11):

-Un orificio ventral anormal del meato uretral, que puede estar ubicado en cualquier lugar entre la parte ventral del glande y el periné.

-Una curvatura ventral anormal del pene (encordamiento o chorda).

-Una distribución anormal del prepucio, con un capuchón dorsal y prepucio deficiente en la parte ventral.



Figura 11. Anomalías asociadas a hipospadias:  
a) Meato en cara ventral b) Curvatura ventral. d) capuchón prepucial.

Por tanto, en su corrección quirúrgica hay que considerar todos estos aspectos; así, debemos distinguir entre corrección de la curvatura peneana (ortoplastia), reconstrucción uretral (uretroplastia), del meato (meatoplastia), del glande (balanoplastia) y cubierta cutánea.

Clínicamente el hipospadias no causa síntomas, y no está asociado a una mayor tasa de infección del tracto urinario. Los pacientes con hipospadias pueden presentar infertilidad secundaria a una eliminación anómala del semen por la localización anómala del meato y la incurvación peneana asociada.

En los casos de hipospadias complejos, con gran incurvación y meato muy proximal puede llegar a aparentar un estado intersexual. Son los casos más graves, que si bien no presentan sintomatología física, sí que producen serios problemas psicológicos a los pacientes, que sufren dificultades para las relaciones sociales y por supuesto, de pareja.

- **Epispadias:** El meato uretral se encuentra en el dorso del pene (Figura 12). En esta anomalía, el tubérculo genital en lugar de haberse desarrollado en el borde craneal de la membrana cloacal, parece haberse formado en la región del tabique uorrectal. Por tanto, parte de la membrana cloacal ocupa un lugar craneal con respecto al tubérculo genital, y cuando esta membrana se rompe, la desembocadura del seno urogenital se sitúa en la porción craneal del pene.

El defecto que constituye es la ausencia de la parte dorsal de la uretra y de la piel suprayacente. La anomalía se extiende hasta el cuello de la vejiga en los casos con afectación proximal más grave, presentando en estos casos incontinencia urinaria por alteración del mecanismo del esfínter urinario. El meato desplazado puede encontrarse sobre el glande, el cuerpo peneano o la región penopubiana. El pene presenta desviación dorsal y puede mostrar una incurvación ventral dolorosa en su parte dorsal. Los cuerpos cavernosos aparecen desplegados lateralmente debido a su unión a los huesos púbicos separados. Los objetivos de la reparación del epispadias penopubiano incluyen el logro de la continencia urinaria con conservación del tracto urinario superior y la reconstrucción de genitales estéticamente aceptables.



Figura 12. Epispadias

**-Extrofia vesical:** La mucosa de la vejiga queda expuesta al exterior. En condiciones normales, la pared abdominal que se encuentra por delante de la vejiga está formada por el mesodermo de la línea primitiva, que emigra alrededor de la membrana cloacal. Cuando no se produce esta migración, la rotura de la membrana cloacal puede extenderse en dirección craneal y genera la extrofia vesical (Figura 13). Esta anomalía puede asociarse o no a epispadias, en la mayoría de los casos se presentan juntas, formando parte del complejo extrofia vesical-epispadias, o bien presentarse de forma aislada, lo que es menos frecuente.

En esta patología confluyen 3 características:

- La pared vesical queda expuesta.
- La uretra está abierta.
- Existe una diástasis púbica.



Figura 13. Extrofia de vejiga

- **Válvulas uretrales posteriores:** (Figura 14). Es una obstrucción congénita de la uretra proximal, que origina una obstrucción a la salida vesical dando lugar a un amplio espectro de daños en todo el tracto urinario.

Las válvulas son membranas obstructivas en la luz de la uretra que se extienden desde el verumontanum distalmente. Sólo ocurren en varones, con una incidencia de 1/4000 recién nacidos; y son la primera causa de fallo renal y trasplante renal en población pediátrica.

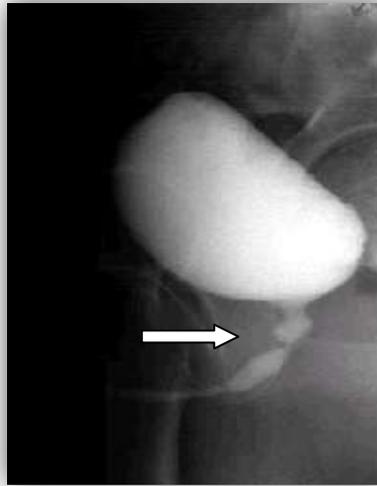


Figura 14. Imagen radiológica de válvulas uretrales por cistouretrografía. La flecha señala la localización de las válvulas.

- **Válvulas uretrales anteriores:** Son muy raras. Son en casi todos los casos un divertículo uretral congénito. Durante la evacuación de la orina, el divertículo se infla en dirección ventral y distal por debajo del cuerpo esponjoso adelgazado. El margen dorsal libre del divertículo se extiende dentro de la luz uretral y ocluye el flujo urinario. Se pueden localizar en cualquier porción de la uretra.

- **Divertículos uretrales:** Pueden ser saculares, globulares y pueden también formar parte de una megauretra. Su etiología no está clara pero puede producirse por una fusión incompleta de un segmento de la placa uretral o por un desarrollo focal incompleto del cuerpo esponjoso que engloba la mucosa uretral por un soporte inadecuado.

- **Megauretra:** Es una dilatación no obstructiva de la uretra, entidad poco frecuente asociada con un desarrollo anormal del cuerpo esponjoso y en ocasiones de los cuerpos cavernosos. Se asocia con frecuencia al síndrome de ciruela pasa.

- **Duplicación uretral:** Es una anomalía poco frecuente, compleja, se cree que sus variaciones se deben a diversas anomalías embriológicas. Se clasifican en dorsales y ventrales.

- **Pólipos de la uretra prostática:** Un error en el desarrollo durante el proceso de invaginación del material glandular submucoso de la zona interna de la próstata puede ser el origen de esta malformación. Se localizan generalmente a nivel de la uretra prostática.

- **Atresia uretral:** Asociada a la atresia de pene, puede presentarse como atresia uretral aislada o con fístula vésico-rectal. Cuando existe una atresia uretral completa sin fístula debe estar presente el uraco para que sea compatible con la vida.

### 1.5.2. PATOLOGÍAS ADQUIRIDAS

- **Traumatismos uretrales:** Generalmente secundarios a traumatismos en silla de montar y fracturas pélvicas.

- **Estenosis:** Es la reducción de la luz uretral secundaria a un proceso cicatricial (Figura 15). Todo proceso que lesiona el epitelio uretral o el cuerpo esponjoso subyacente y cura con una cicatriz puede producir una estenosis uretral. En general, las causas de estenosis se pueden dividir en tres grandes grupos: inflamatorias, traumáticas e idiopáticas.



Figura 15. Estenosis uretrales

**- Tumores:**

Carcinoma de uretra.

Tumores benignos de uretra: Tumores epiteliales, condilomas acuminados, pólipos fibroepiteliales (Figura 16), uretritis papilar y carúnculas uretrales entre otros.



Figura 16. Pólipo uretral.

## **1.6. TECNICA DE INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN HUMANOS**

De todos los tejidos disponibles, los injertos más usados en la actualidad son la mucosa oral, la piel prepucial (cuando está disponible), y flaps de piel prepucial y peneana con aporte sanguíneo propio. El uso del tejido más apropiado para este fin ha sido motivo de controversia, especialmente en términos de qué tipo de tejido usar, como colgajo o injerto y en qué zonas de la uretra (Patterson y cols. 2008).

El uso de mucosa oral en la cirugía uretral fue descrita por primera vez en 1941 por Humby (Humby 1941). No hay más publicaciones hasta 1980; a partir de ahí ha ido ganando adeptos considerándose un material versátil como injerto y válido para reparar la uretra (Burger y cols. 1992; el-Kasaby y cols. 1993; Duckett y cols. 1995;

Bhargava y cols. 2004). Es especialmente adecuado por ser un epitelio húmedo, que se puede tomar fácilmente, resiste a la recidiva de estenosis (especialmente cuando hay balanitis xerótica obliterante) y es fácil de manipular quirúrgicamente. La mucosa oral posee una submucosa densa, con una lámina propia delgada y con una importante red capilar, lo que le facilita la imbibición de nutrientes del lecho y la formación temprana de neovascularización (Venn y cols. 1998).

La mucosa oral puede usarse como un parche Onlay, completamente tubularizada, o combinada con otros injertos libres como la mucosa vesical o piel vascularizada. Para el uso de mucosa oral se marca un injerto de tamaño apropiado de mucosa de mejilla o de la cara interna del labio inferior o superior, con cuidado de evitar el conducto de Stenon y respetando el músculo bucinador. El uso de mucosa bucal por técnica de aposición obtiene mejores resultados que la de tubularización.

La mejilla adulta proporciona hasta 6 cm, y el labio hasta 4cm, con una anchura de 12-15mm (Figura 17). No se recomienda extenderse hasta la comisura de la boca para combinar segmentos de mejilla y labio, ya que puede causar una contractura significativa de la comisura de la boca.

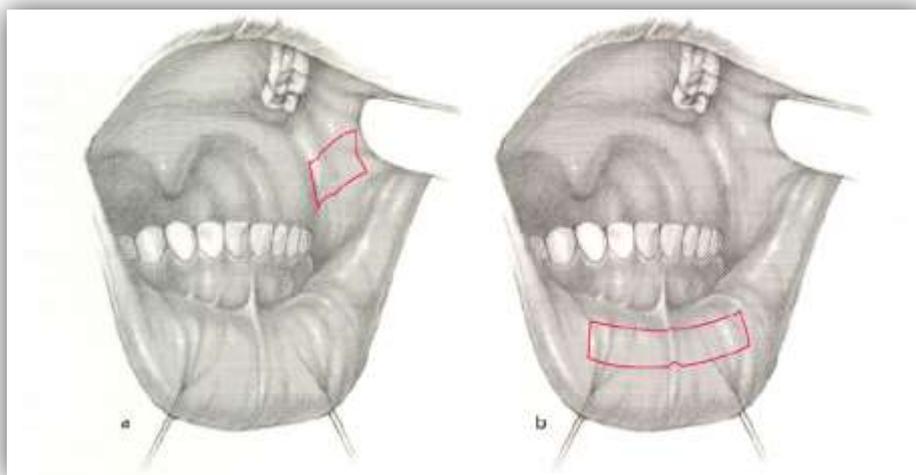


Figura 17. Zonas para tomar injerto de mucosa oral.

El injerto de mucosa oral obtenido no puede tubularizarse en longitudinal para crear un cilindro de 6cm, ya que la anchura es insuficiente. Pueden colocarse en sentido longitudinal para conseguir trayectos más cortos, de hasta 2 o 3 cm de largo. Cuando hay disponibilidad de piel prepucial pero es insuficiente para tubularizar, puede usarse una combinación con una tira de mucosa oral para hacer la neouretra. En reconstrucciones uretrales muy largas, la mucosa vesical puede usarse para la uretra proximal, reservando la mucosa oral para la zona distal y el meato (Ahmed T. Hadidi 2004).

### **1.6.1. FORMAS DE COLOCAR EL INJERTO DE MUCOSA ORAL**

Una vez tomado el injerto de mucosa oral, éste puede ser colocado en el lecho uretral en distintas posiciones, dependiendo de la zona que se necesite reparar (Figura 18).

Parche Onlay: La placa uretral o la uretra previamente reconstruida se fija en la línea media extendiéndola desde la uretra nativa normal hasta el glande. Esta tira de tejido puede variar en anchura desde unos milímetros hasta 1cm. La uretra nativa se incide proximalmente al menos 1cm para crear una unión espatulada. El injerto se recorta con una longitud y anchura adecuadas, y se anastomosa a los márgenes de la tira uretral, usando suturas de 6/0 y 7/0. Las alas del glande se colocan envolviendo la uretra para proporcionar un meato terminal. Es recomendable cerrar la piel del pene con dos capas de tejido bien vascularizado.

Uretroplastia tubular: Usando un injerto plegado o dos segmentos de mucosa oral, se puede crear un cilindro mucoso lo suficientemente largo como para cubrir el defecto uretral. La anastomosis proximal debe estar bien espatulada, y las alas del glande sirven para tubulizar el meato terminal. Después debe cubrirse con 2 capas de piel.

Uretroplastia tubular compuesta: Una técnica de tubulización compuesta es válida cuando queda piel prepucial después de una cirugía previa, pero es insuficiente para completar la uretroplastia. La tira de piel prepucial se moviliza con su pedículo vascular y el injerto de mucosa oral se anastomosa para crear el cilindro compuesto, que se coloca en la cara ventral del pene, con la piel devascularizada colocada sobre

los cuerpos cavernosos y la mucosa oral superficialmente, que deberá cubrirse con dos capas de piel peneana.

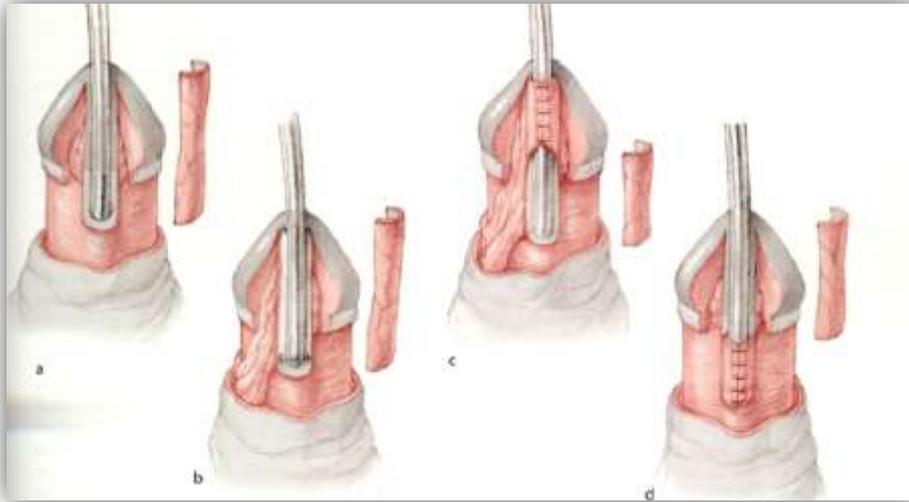


Figura 18. Diferentes técnicas para colocar el injerto de mucosa oral.

La mucosa oral está demostrando resultados satisfactorios como material para reconstrucción uretral, particularmente en hipospadias complejos en los que se han realizado múltiples procedimientos quirúrgicos previos. La frecuencia de problemas meatales, dilatación uretral y megauretra es menor que con mucosa vesical. Puede ser debido a que los factores de crecimiento de la mucosa promueven una rápida cicatrización y la revascularización ocurre rápidamente por la delgada lámina propia y el gran lecho vascular del que se toma la mucosa oral.

La experiencia indica que existe un porcentaje de reintervenciones de aproximadamente 20% (Manzoni GM 1999); la mayoría debidos a fístulas o revisión del meato. En casos complicados, el tratamiento preoperatorio con testosterona puede mejorar la vascularización de la piel peneana y favorecer las posibilidades de éxito con una técnica de injerto libre.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Analizar cambios histológicos que se originan en los injertos de mucosa oral cuando se colocan en uretra.

### **Objetivos específicos:**

1.- Descripción de una técnica para la sustitución de la uretra de rata por mucosa oral autóloga (uretroplastia con injertos de mucosa oral).

2.- Evaluación funcional de la viabilidad in vivo de los injertos de mucosa oral implantados en la uretra de la rata de laboratorio.

3.- Evaluar las modificaciones tisulares que ocurren en los injertos implantados a nivel uretral mediante análisis de las características histológicas de los mismos con microscopía óptica y electrónica de barrido.

4.- Análisis de expresión de marcadores epiteliales en los tejidos implantados mediante inmunohistoquímica para marcadores de diferenciación uretral (CK 1, CK 4, CK 13 y filagrina).

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio han sido utilizadas 26 ratas Wistar macho (Figura 19) de aproximadamente 250gr de peso, sometidas a intervención quirúrgica bajo anestesia general.



Figura 19. Rata wistar

Todos los animales han sido intervenidos en los quirófanos de la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (Figura 20).



Figura 20. Quirófano Unidad Cirugía Experimental

### **3.1. MATERIAL QUIRÚRGICO**

Ha sido utilizado material individualizado para cada campo quirúrgico, oral y uretral en cada intervención.(Figura 21)

- Tijeras de Steel de punta roma y fina.
- Pinzas de Adson finas con y sin dientes.
- Mosquitos.

-Suturas: Seda 4/0 (Silkam®), sutura de reabsorción rápida trenzada de 7/0 (Safyl quick®), sutura monofilamento irreabsorbible 6/0 y 7/0 (Surgilene®).

-Catéter de canalización de 3F.

-Bisturí de microcirugía desechable.

-Material microquirúrgico: Tijeras, portaguijas, pinza de relojero curva y recta.



Figura 21. Material quirúrgico

## 3.2. INTERVENCIÓN

### 3.2.1. ANESTESIA

Preparación de ketamina 50mg/ml (Ketolar®): 2cc, atropina 1mg/ml: 0.2cc y acepromacina 0.5cc; inyectándose inicialmente una cantidad de 1.5cc intraperitoneal con aguja de insulina.

### 3.2.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Posición en decúbito supino; preparación del campo quirúrgico con betadine. En el primer tiempo de la intervención se realiza extracción de mucosa oral de labio inferior (Figura 22). Tamaño aproximado 0.4 X 0.3 cm de media (Figura 23); cerrando el defecto con sutura continua de Safil quick® de 7/0 (Figura 24). El injerto se coloca en solución de gentamicina al 0'2% y suero fisiológico durante el tiempo en el que se prepara la uretra para colocarlo.



Figura 22. Toma injerto de mucosa oral



Figura 23. Toma muestra mucosa oral.



Figura 24. Cierre defecto mucosa oral

Posteriormente se canaliza la uretra con catéter venoso 3F que se fija con punto transfixiante al glande. Tras realizar una incisión circular a 2 mm del surco balanoprepucial, se desliza la piel hasta la base del pene. Se secciona longitudinalmente 0'4 cm. de la uretra desde unos 3 mm. por debajo del surco en dirección proximal.(Figura 25)



Figura 25. Sutura del injerto en uretra y marcado de límites del injerto

En el defecto creado se sutura el parche de mucosa oral tipo Onlay con sutura continua bilateral de Safil quick® 7/0, con la cara mucosa del injerto formando la luz de la neouretra. Se marcan los puntos laterales y cráneocaudales del injerto con Surgilene® 7/0 (Figura 25 y Figura 26) y se retira sondaje.



Figura 26. Injerto suturado

Se vuelve a cubrir el pene con piel que se sutura con puntos sueltos de Safil quick® 7/0.

El animal pasa a una jaula metabólica durante las siguientes 48 horas en las que recibe tratamiento antibiótico oral con gentamicina diluida en el agua de bebida. Posteriormente es sacrificado según el periodo estimado.

### **3.2.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para el sacrificio de los animales se siguió el siguiente protocolo:

Se estableció un calendario para analizar las modificaciones en el epitelio cada 10 días, de manera que los animales fueron sacrificados aproximadamente a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 días.

El procedimiento consistió en inyectar anestesia intraperitoneal con la misma preparación que en el tiempo operatorio y una vez dormido el animal, inyección intracardíaca de potasio.

Tras el sacrificio del animal, se canaliza uretra con abocath® del nº22. Se denuda la piel del pene y se identifica la uretra, observando los puntos cardinales de marcaje del injerto realizados con sutura irreabsorbible. Se envía a analizar todo el pene en bloque seccionado por su base. (Figura 27)

La pieza se incluye en formol hasta su análisis y procesamiento en laboratorio.



Figura 27. Toma de muestra de uretra con el injerto

### 3.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras han sido analizadas en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

### **3.3.1. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS INJERTOS DE MUCOSA ORAL EN URETRA**

#### **3.3.1.A. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, tanto las muestras control como los tejidos injertados se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4 $\mu$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

#### **3.3.1.B. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), desecándose por completo mediante el método del punto crítico (Fernandez-Segura y cols. 1999). Este método consiste en la sustitución de la acetona tisular, junto con cualquier resto de agua que pudiese quedar en las muestras, por CO<sub>2</sub> líquido en frío. A continuación, el CO<sub>2</sub> es evaporado a baja presión, aumentándose progresivamente la temperatura, hasta que la muestra queda desecada por completo. Una vez desecados, los tejidos fueron recubiertos por átomos de oro y analizados en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

#### **3.3.1.C. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 h a 4°C, utilizando como agente intermedio el óxido de

propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la polimerización de la resina durante 2 h a 60°C. Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichter Ultracut.

El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uracilo al 2% en agua destilada durante 10 minutos y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds(Reynolds 1963).

La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania).

### **3.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA**

La detección de proteínas específicas de las principales citoqueratinas (CKs) y de PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) se llevó a cabo utilizando diversas muestras de tejidos, las cuales se describen a continuación:

- En primer lugar, se utilizaron controles de mucosa oral normal procedentes de animales sanos.

- En segundo lugar, se utilizaron muestras de mucosa oral implantada en uretras de animales sanos y extirpada para su estudio previo sacrificio del animal, según calendario establecido.

- Finalmente, se analizaron muestras de mucosa uretral normal procedentes de animales sanos.

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, las muestras tisulares se desparafinaron en xileno, se lavaron en alcohol y se rehidrataron con agua. A continuación, tras inactivar las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrogeno, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión a los anticuerpos mediante incubación en albúmina sérica bovina. Una vez lavadas, se procedió a hervir las secciones tisulares en tampón citrato para favorecer la presentación de los epitopos proteicos. Una vez enfriadas las muestras, éstas se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 1)

durante 2 h a temperatura ambiente, lavándose en PBS a continuación. Para la detección de los anticuerpos primarios unidos a las proteínas tisulares, se utilizaron anticuerpos secundarios, en este caso frente a anticuerpos de ratón marcados con peroxidasa de rábano, así como estreptavidina. Para la detección de la reacción colorimétrica, se utilizó biotina comercial, que adquiere un color marrón oscuro cuando es oxidada por la peroxidasa.

Una vez llevada a cabo la reacción inmunológica, contando con la presencia de controles positivos y negativos, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron utilizando cubreobjetos de vidrio, para ser analizadas en un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 90i.

Anticuerpos primarios	Dilución	Laboratorio Comercial	Referencia
<b>Anti-Pancitoqueratina</b>	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain	0016007QD
<b>Anti-CK4</b>	1:1000	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C 5176
<b>Anti-CK13</b>	1:400	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C 0791
<b>Anti- Filagrina</b>	1:50	ABCam	SPM <sub>181</sub>
<b>Anti CK 1</b>	1:500	Sigma	HPA <sub>017917</sub>

**Tabla 1.** . Anticuerpos Primarios usados en este trabajo y la dilución correspondiente para cada prueba Inmunohistoquímica. Laboratorio comercial y referencia para cada anticuerpo.

La evaluación de los resultados se realizó determinando la presencia de señales positivas a dos niveles:

1) Localización de la señal de expresión:

- Homogénea, si existe expresión de la proteína en todo el espesor del epitelio.
- Basal, si existe expresión a nivel del estrato basal.
- Suprabasal, incluyendo en ésta el estrato espinoso, granuloso, hialino y córneo.

2) Intensidad de expresión de la proteína:

- (-) Nula expresión.
- (+) levemente positiva.
- (++) positiva.
- (+++) fuertemente positiva.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

El procedimiento quirúrgico es factible, pero es preciso poseer habilidad quirúrgica y estar familiarizado con el material de microcirugía para realizar la intervención. El tiempo quirúrgico empleado es de aproximadamente 45 minutos en cada intervención, si bien hemos observado una disminución significativa en el mismo una vez realizadas las primeras intervenciones.

Se demostró una buena tolerancia de casi todos los animales al proceso anestésico y quirúrgico. Durante el proceso de la inducción anestésica se produjeron 2 muertes por lo que no se llegó a realizar la intervención quirúrgica de dichos animales.

La evolución postoperatoria fue satisfactoria en el 90% de los casos, apreciándose micción adecuada en todos los animales, no existiendo ningún caso de obstrucción urinaria. Salvo dos incidencias todos los animales tuvieron un curso postquirúrgico adecuado. Tras el sacrificio se realizó una exploración física del animal, en busca de posibles secuelas locales. A nivel peneano se detectaba por palpación la sutura irreabsorbible que era colocada a modo de marcaje de los puntos cardinales del

injerto. Posteriormente se procedía a realizar sondaje uretral, pudiendo evidenciar la inexistencia de estenosis uretrales ni de meato; tampoco se identificaron incurvaciones peneanas secundarias a cicatrización anómala.

Las complicaciones acontecidas fueron en un caso una infección local a las 48 horas de la intervención, que conllevó la pérdida del injerto y aparición de un granuloma en la zona, (esta complicación se produjo en el primer animal intervenido, que no fue colocado en jaula metabólica durante las primeras 48 horas del postoperatorio inmediato). En otro caso apareció una fístula uretro-cutánea, que no impidió el análisis final de la muestra ya que el resto del injerto prendió adecuadamente.

La zona donante oral fue revisada en todos los casos en el momento del sacrificio del animal. No observamos cicatrizaciones anómalas, ningún animal presentó alteraciones funcionales bucales ni cicatrices retráctiles, permitiendo durante todo el periodo de estudio una alimentación normal.

## **4.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

### **4.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Mediante microscopía óptica, las muestras controles de mucosa oral normal mostraron múltiples capas epiteliales bien diferenciadas y las típicas formas histológicas de crestas epiteliales y papilas coriales (*Figura 28*). A nivel corial, se apreciaron numerosos vasos sanguíneos, fibras de colágeno y células estromales.

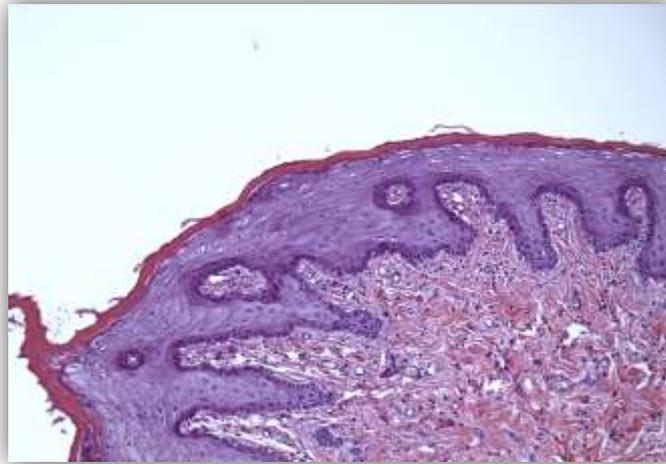


Figura 28. Mucosa oral control con epitelio estratificado.

En la uretra control se observó un epitelio pseudoestratificado rodeado de tejido conectivo muy vascular y células musculares lisas (Figura 29).

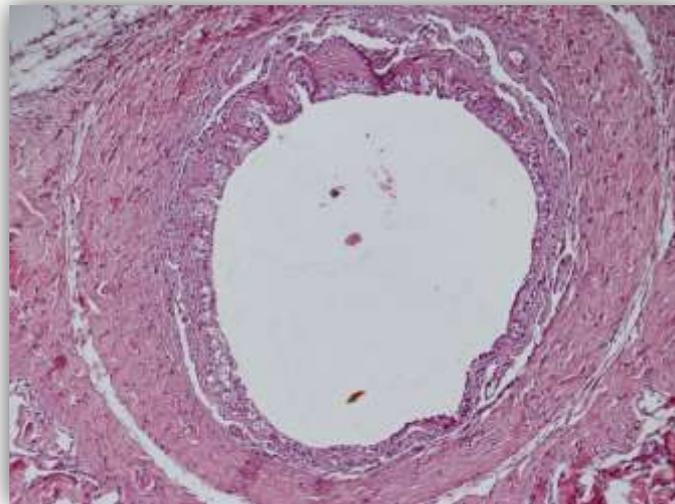


Figura 29. Uretra control con epitelio pseuroestratificado.

El análisis histológico de los injertos de mucosa oral realizados a nivel de la uretra demostró la adecuada biointegración del tejido oral en el tejido receptor, no existiendo en ningún caso la existencia de tumores, rechazo inmunológico o necrosis.

En primer lugar, las muestras analizadas a los 10 días del injerto revelaron la adecuada integración del mismo, con un pequeño porcentaje de células epiteliales en diferentes estadios apoptóticos (Figura 30), con leves signos inflamatorios en el estroma y pérdida de algunas capas celulares en el epitelio. En el estroma, se apreció un gran número de vasos sanguíneos neoformados.

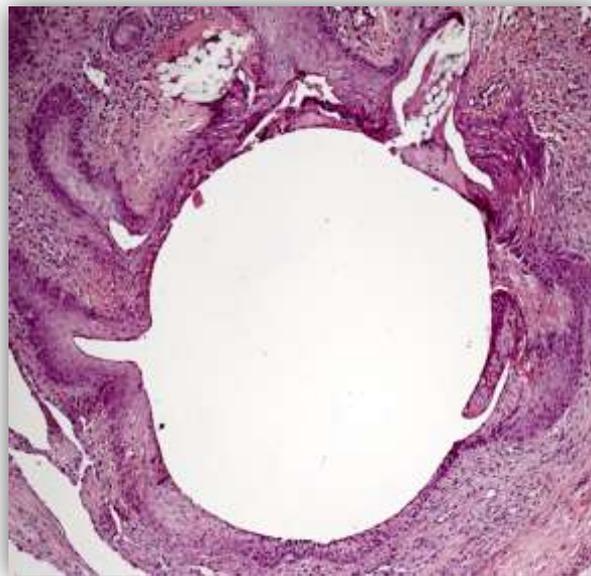


Figura 30. Muestra 10 días postimplante. La uretra nativa del animal se aprecia en la parte inferior de la imagen, mientras que la mucosa oral injertada se puede observar en la parte superior.

Las muestras analizadas a los 20 días mostraron adecuados niveles de integración en todas sus capas, con un estroma rico en fibras de colágena y fibroblastos y abundantes vasos sanguíneos y un epitelio escamoso estratificado histológicamente similar a la mucosa oral (Figura 31). No existían signos de apoptosis o muerte celular en este estadio. A nivel estromal, se encontraron numerosos vasos sanguíneos.

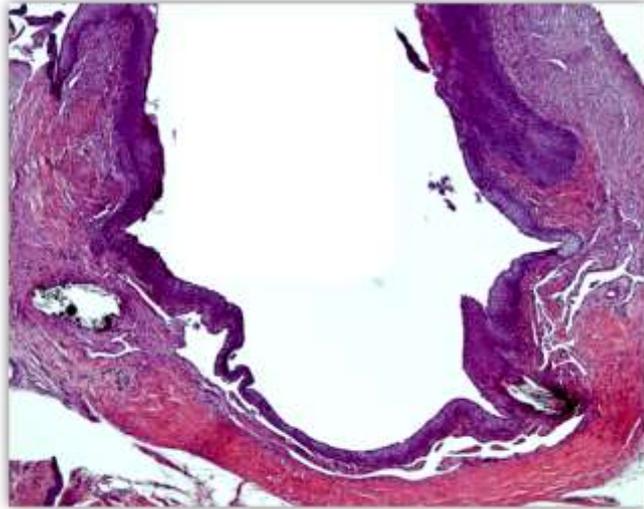


Figura 31. Muestra 20 días postimplante. La uretra nativa del animal se aprecia en la parte inferior de la imagen, mientras que la mucosa oral injertada se puede observar en la parte superior en ambos laterales.

A los 20 días, podemos observar el detalle de la sutura empleada en la realización de la uretroplastia, se trata de sutura multifilamento, trenzada reabsorbible 7/0, esta imagen nos ayuda a identificar con seguridad la zona del injerto (Figura 32).

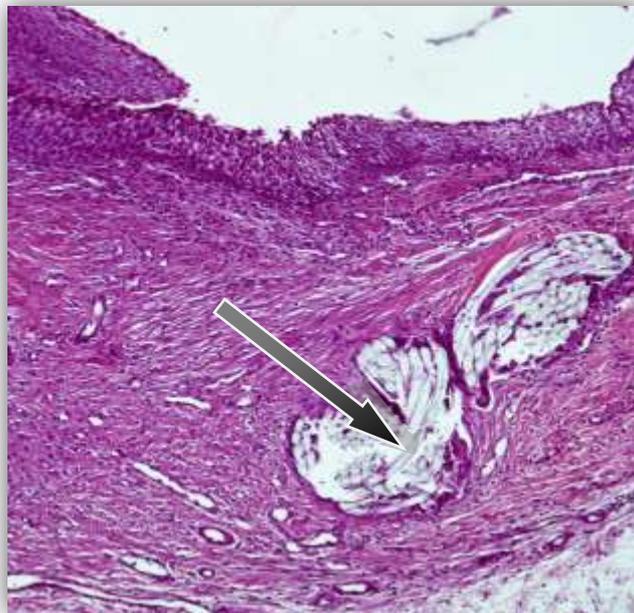


Figura 32. Sutura reabsorbible trenzada.

Las muestras analizadas a los 30 días mostraron la adecuada integración de los injertos, con un estroma bien estructurado y un epitelio cuya morfología y estructura aún era más similar a la existente en la mucosa oral control que al epitelio uretral nativo, con células de citoplasma más acidófilo que las uretrales, formando un epitelio estratificado de 2-3 capas (Figura 33).

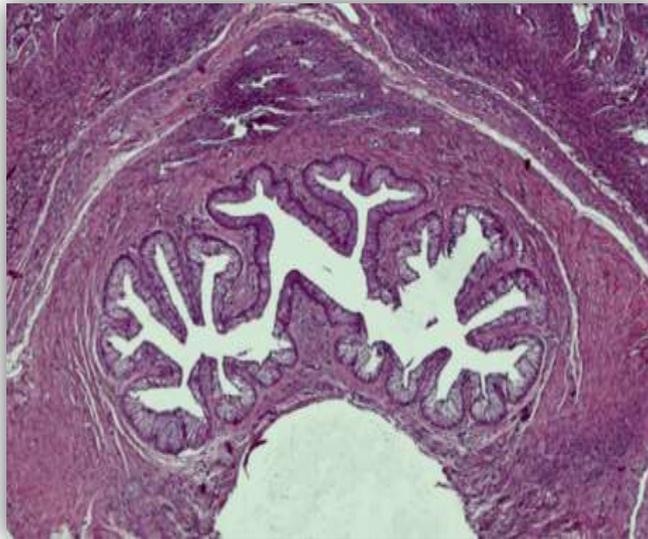


Figura 33. Muestra 30 días postimplante. La uretra nativa del animal se aprecia en la parte inferior de la imagen, mientras que la mucosa oral injertada se puede observar en la parte superior.

El análisis de las muestras 40 días después de la intervención (Figura 34), muestra una leve reacción inflamatoria, un epitelio cúbico estratificado en el tejido injertado, con menor número de capas celulares que el epitelio oral.



Figura 34. Muestra 40 días postimplante. La uretra nativa del animal se aprecia en la parte inferior izquierda de la imagen, mientras que la mucosa oral injertada se puede observar en la parte superior.

A los 60 días de la intervención, el análisis histológico aún muestra la presencia de varios estratos en el epitelio de la mucosa oral injertada a nivel uretral (Figura 35).

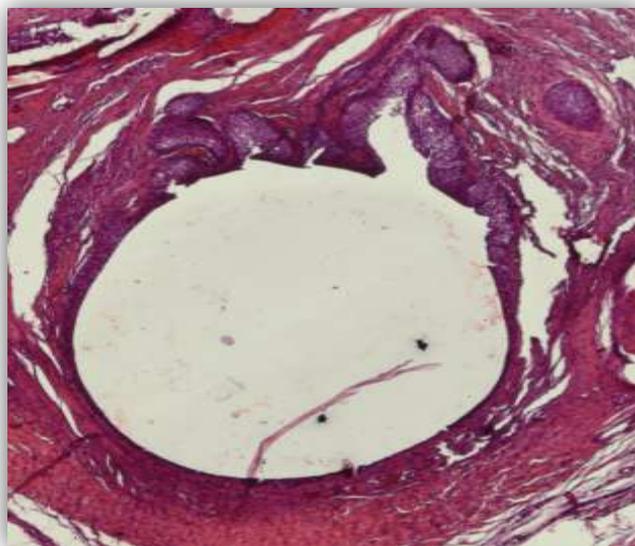


Figura 35. Muestra 60 días postimplante. La uretra nativa del animal se aprecia en la parte inferior de la imagen, mientras que la mucosa oral injertada se puede observar en la parte superior.

En el análisis realizado a los 90 días del implante observamos que el tejido implantado se ha integrado correctamente en el lecho receptor uretral, existiendo un epitelio de tipo pseudoestratificado muy similar al de la uretra nativa y un estroma de estructura idéntica al del estroma del urotelio nativo (Figura 36).

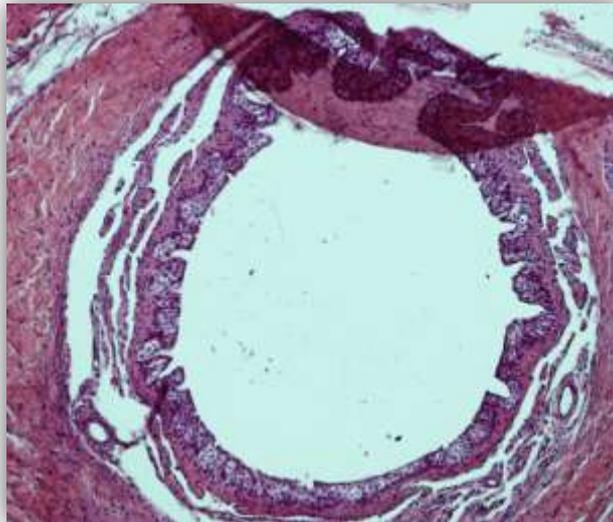


Figura 36. Muestra 90 días postimplante, no es posible distinguir uretra nativa e injerto.

En el presente trabajo se ha realizado un seguimiento y análisis de muestras hasta los 120 días postimplante, momento en el que la biointegración del injerto es completa. Se observa un epitelio pseudoestratificado, sin signos inflamatorios alrededor, con buena vascularización; y no es posible determinar, salvo por los puntos irreabsorbibles de marcado en los puntos cardinales del injerto, la zona injertada y la uretra primitiva normal (Figura 37).

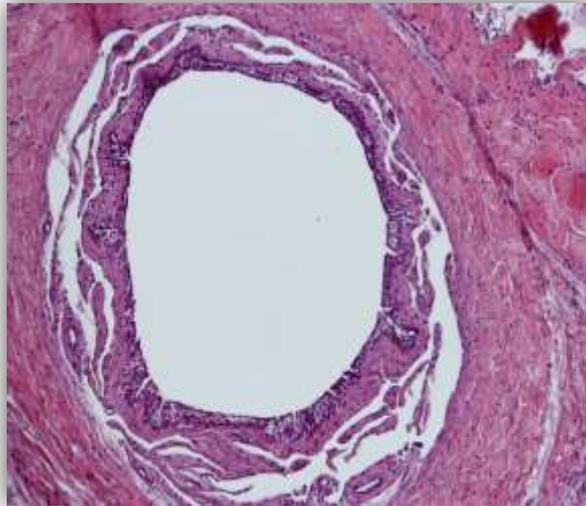


Figura 37. Muestra 120 días postimplante, no es posible distinguir uretra nativa e injerto.

En la siguiente imagen se muestra el detalle de la sutura irreabsorbible monofilamento utilizada para marcar los puntos cardinales del injerto, pudiendo demostrar la ubicación del mismo a pesar de haberse producido la reabsorción de la sutura con la que se realizó el injerto, y por tanto identificando la zona uretral que corresponde al mismo (Figura 38).

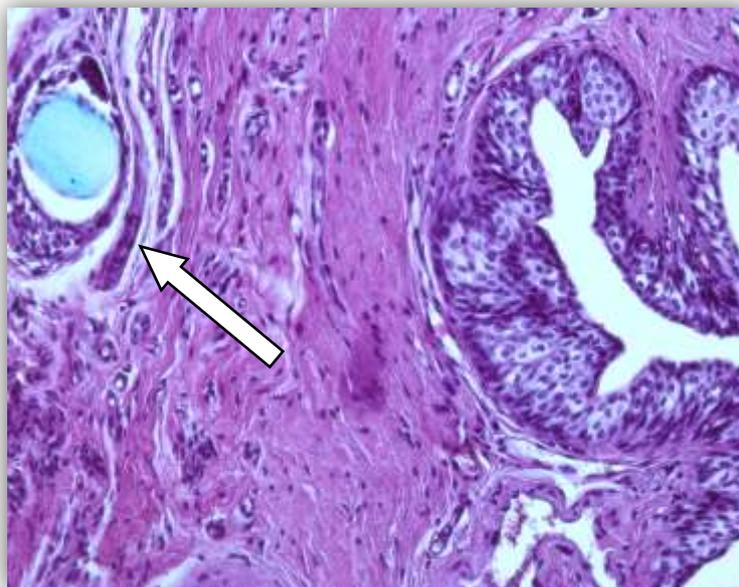


Figura 38. Sutura irreabsorbible marcando puntos cardinales injerto.

#### 4.2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Con microscopía electrónica de barrido podemos observar en la siguiente imagen el epitelio de la mucosa oral control donde se aprecian células correspondientes a epitelio pavimentoso plano, que tienden a la descamación (Figura 39).

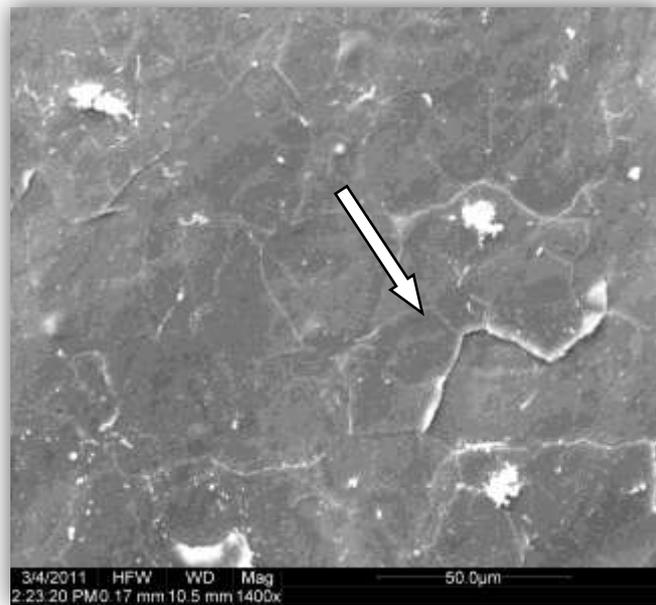


Figura 39. Mucosa oral control. La flecha señala el detalle de las células descamadas.

A los 10 días postimplante vemos la imagen de un corte transversal de la uretra (Figura 40), donde observamos la luz uretral (1), los cuerpos cavernosos (2) y la vena dorsal del pene (3)

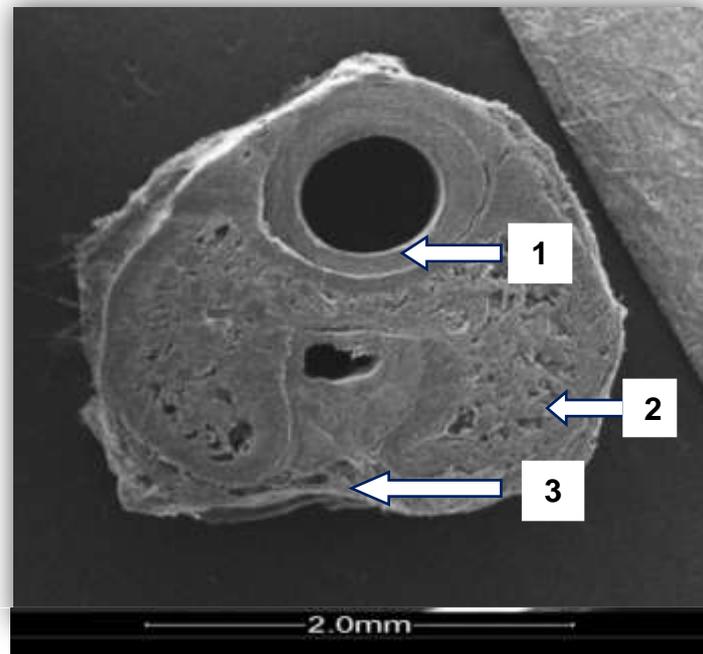


Figura 40. Corte transversal uretra 10 días postinjerto.

A mayor detalle, con muestra del mismo animal podemos observar el epitelio simple correspondiente a urotelio de la uretra nativa, donde se ven células de aspecto aplanado, muy adheridas unas a otras (Figura 41).

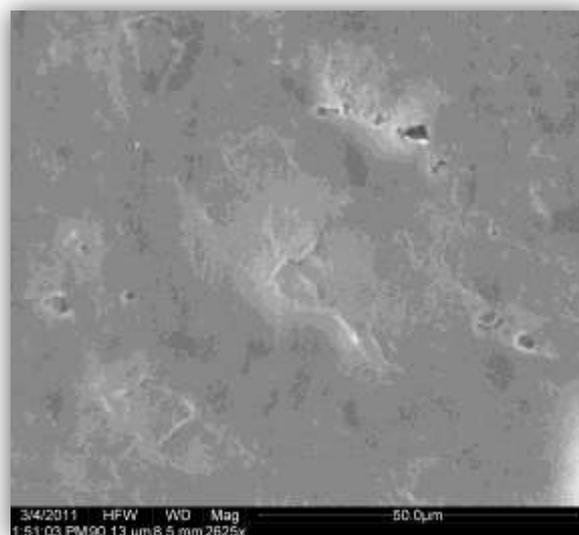


Figura 41. Epitelio simple de uretra nativa

En la siguiente imagen observamos la mucosa oral implantada, se aprecian células de tamaño heterogéneo, con superficie menos aplanada que el caso de uretra y donde observamos algunos marcadores de diferenciación epitelial queratinocítica oral (patrones de superficie en forma de microplicas planas) (Alaminos y cols. 2007) (Figura 42).

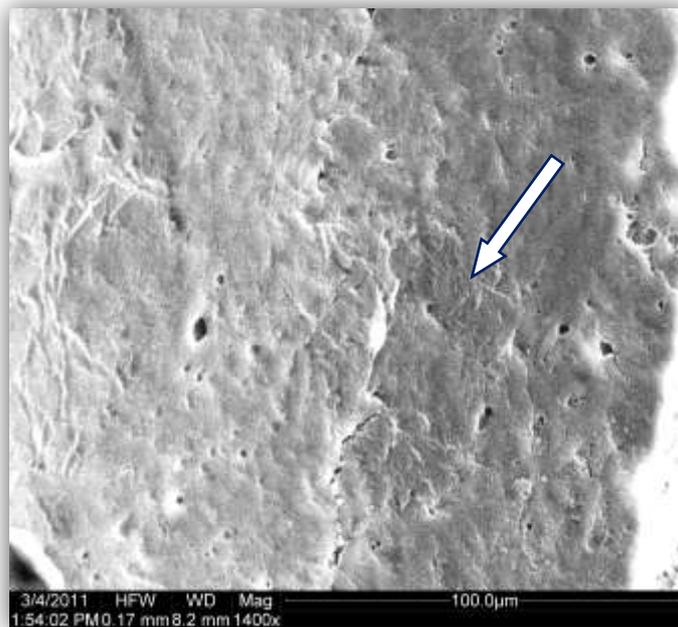


Figura 42. Zona de injerto de mucosa oral. La flecha señala las microplicas planas.

A los 20 días postimplante podemos ver en esta imagen el tejido uretral con la uretra colapsada (Figura 43).



Figura 43. Muestra 20 días postimplante con uretra colapsada.

Por último, en esta misma muestra, a los 20 días postimplante observamos el epitelio correspondiente a la zona de la anastomosis entre la uretra nativa (1) y la mucosa oral implantada (2) (Figura 44).

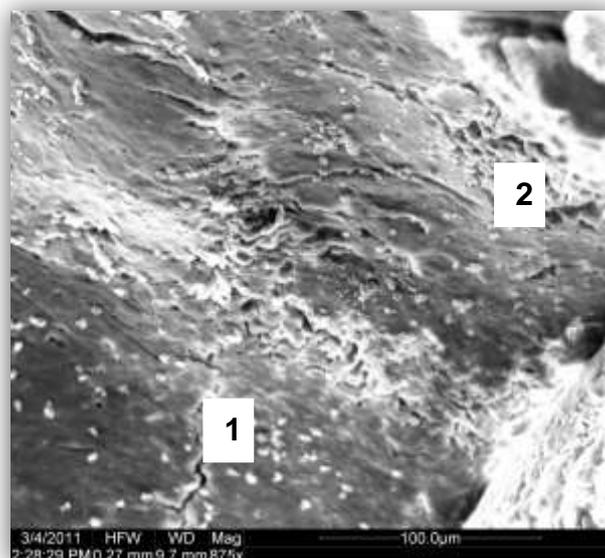


Figura 44. Anastomosis uretra- mucosa oral

### 4.3. INMUNOHISTOQUÍMICA

La expresión de citoqueratinas en uretra control normal y en mucosa oral normal sigue un patrón que se describe a continuación, existiendo marcadas diferencias entre ambas.

La expresión de Pancitoqueratina en uretra es levemente positiva en todas sus capas, mientras que en mucosa oral es positiva en todas sus capas, con marcada expresividad, muy positiva en las capas basal y superficial (Figura 45).

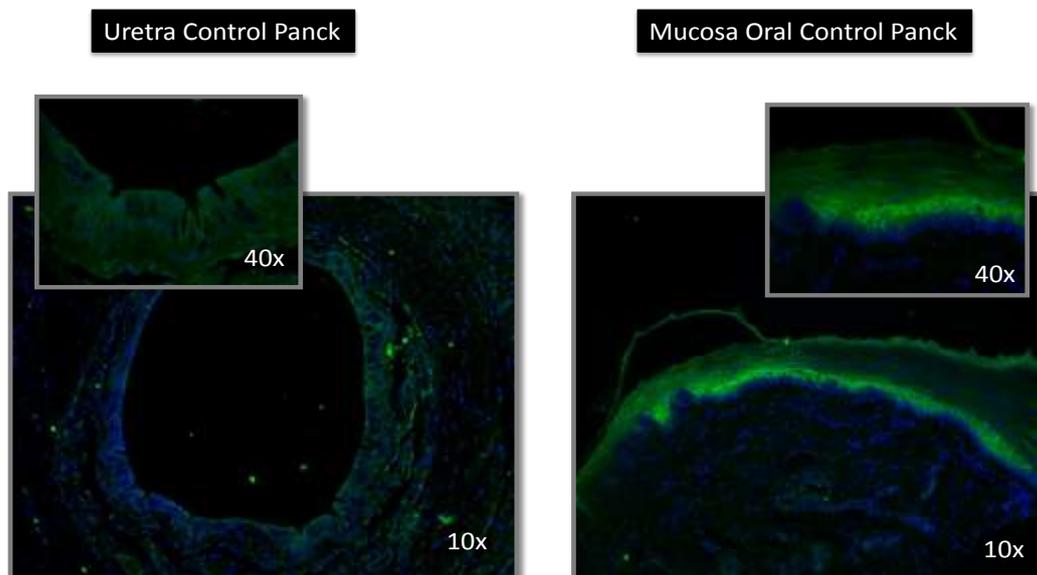


Figura 45. Expresión Pancitoqueratina en uretra y mucosa oral.

La CK4 muestra una expresión muy positiva en la mucosa oral en la capa superficial, y nula expresión en uretra, como se observa en la imagen (Figura 46).

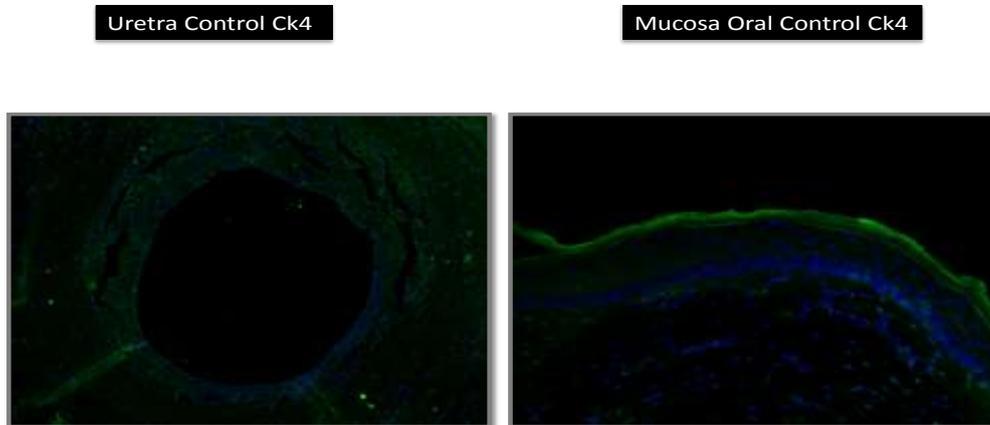


Figura 46. Expresión de Ck4 en uretra y mucosa oral.

La Ck 13 tiene una expresión muy positiva en la capa superficial de la mucosa oral, mientras que manifiesta una expresividad levemente positiva en uretra (Figura 47)

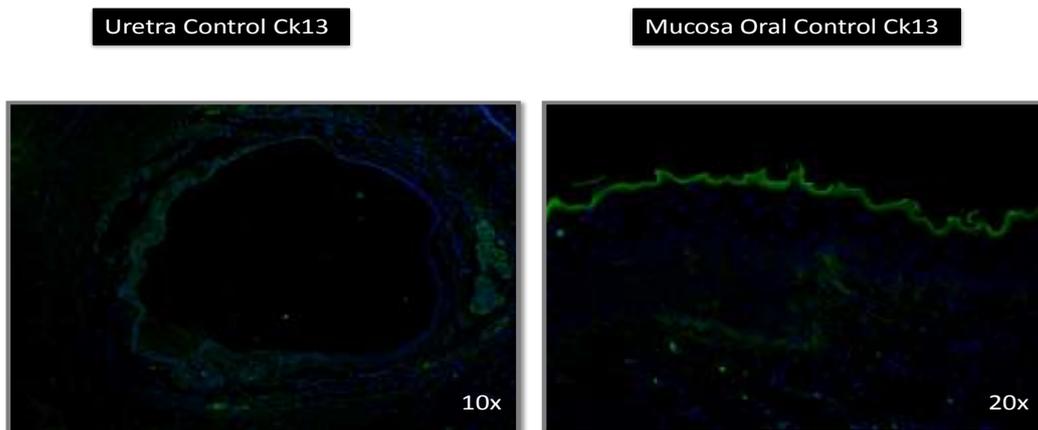


Figura 47. Expresión de CK 13 en uretra y mucosa oral control.

En la expresión de CK 1 existen también diferencias, ya que la uretra no expresa CK 1 mientras que la mucosa oral muestra una expresividad muy positiva en su capa superficial (Figura 48).

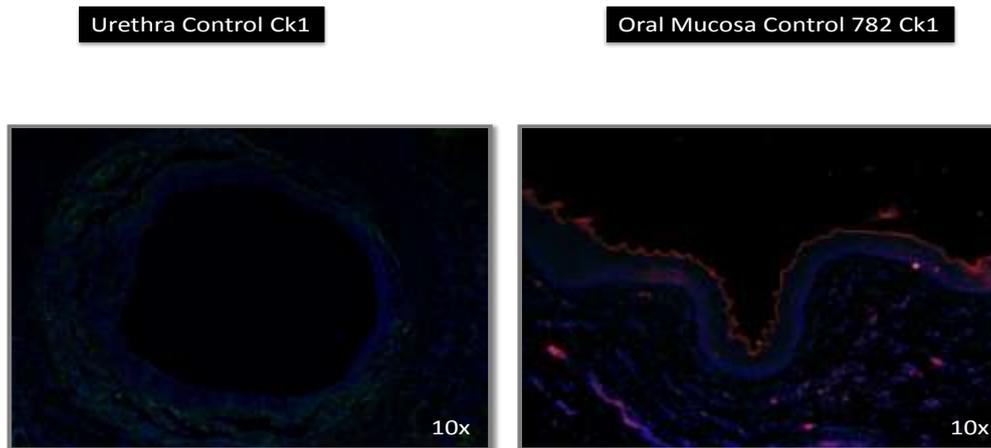


Figura 48. Expresión de CK1 en uretra y mucosa oral control.

Por último, la expresión de filagrina es muy positiva en la capa superficial de la mucosa oral y no se expresa en uretra (Figura 49).

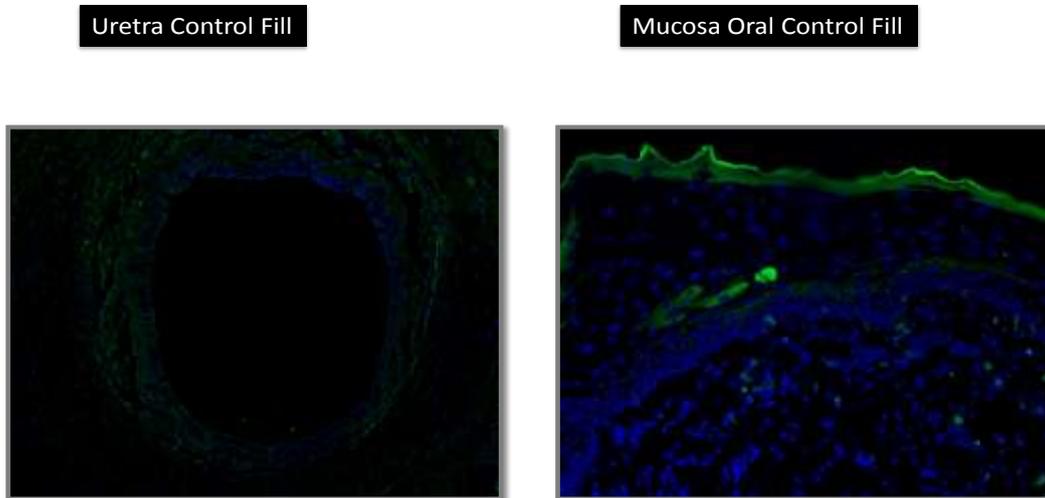


Figura 49. Expresión de Fill en uretra y mucosa oral control.

Por tanto la mucosa oral control (Figura 50) muestra una expresión de citoqueratinas como se resume a continuación:

-Expresividad positiva para pancitoqueratina en todas sus capas, y muy positiva en las capas basal y superficial.

- Expresividad de las CK 4, 13, 1 y filagrina muy positiva en la capa superficial.

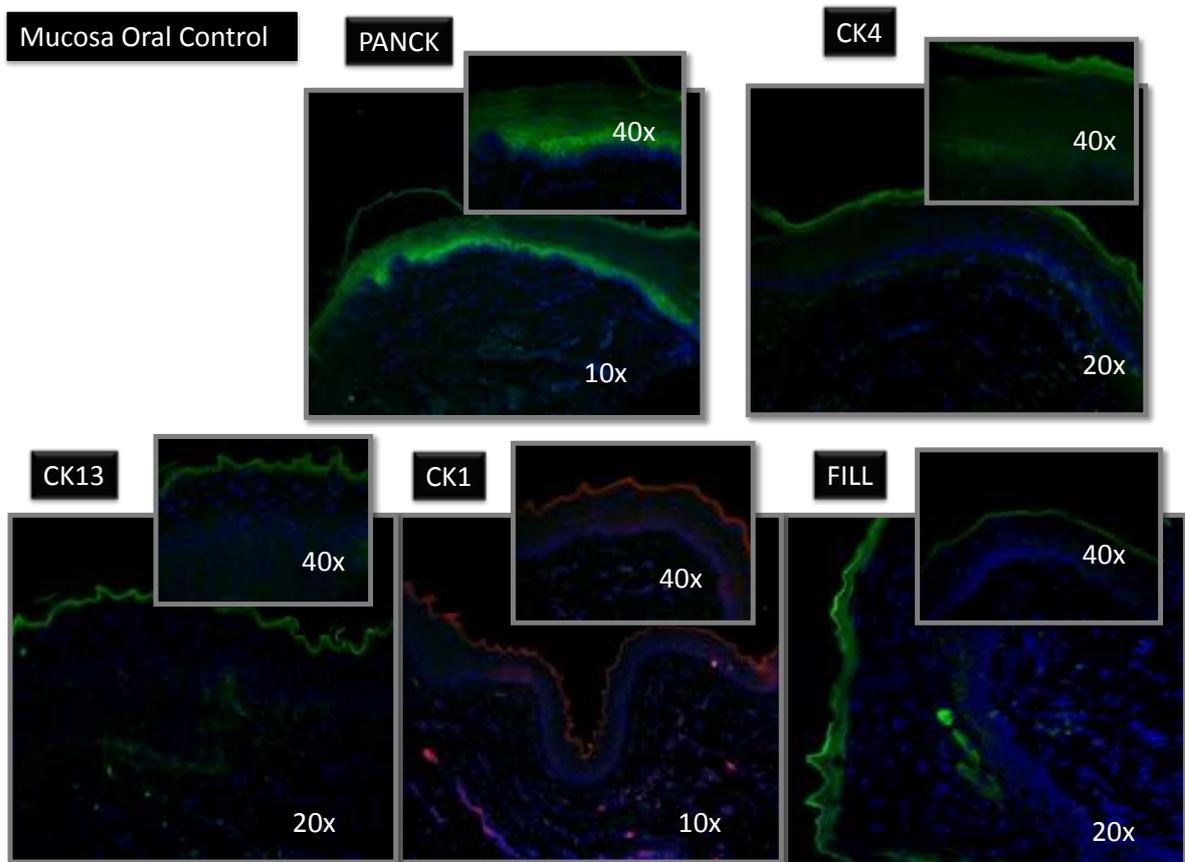


Figura 50. Expresión de citoqueratinas en mucosa oral.

En el caso del epitelio uretral, las citoqueratinas se expresan de forma completamente distinta, como observamos en la imagen (Figura 51):

-Existe nula expresión de CK1 y filagrina, (típicas de los epitelios queratinizados).

-La CK4 y Pancitoqueratina se expresan levemente.

- La expresión de CK 13 es positiva en todas sus capas.

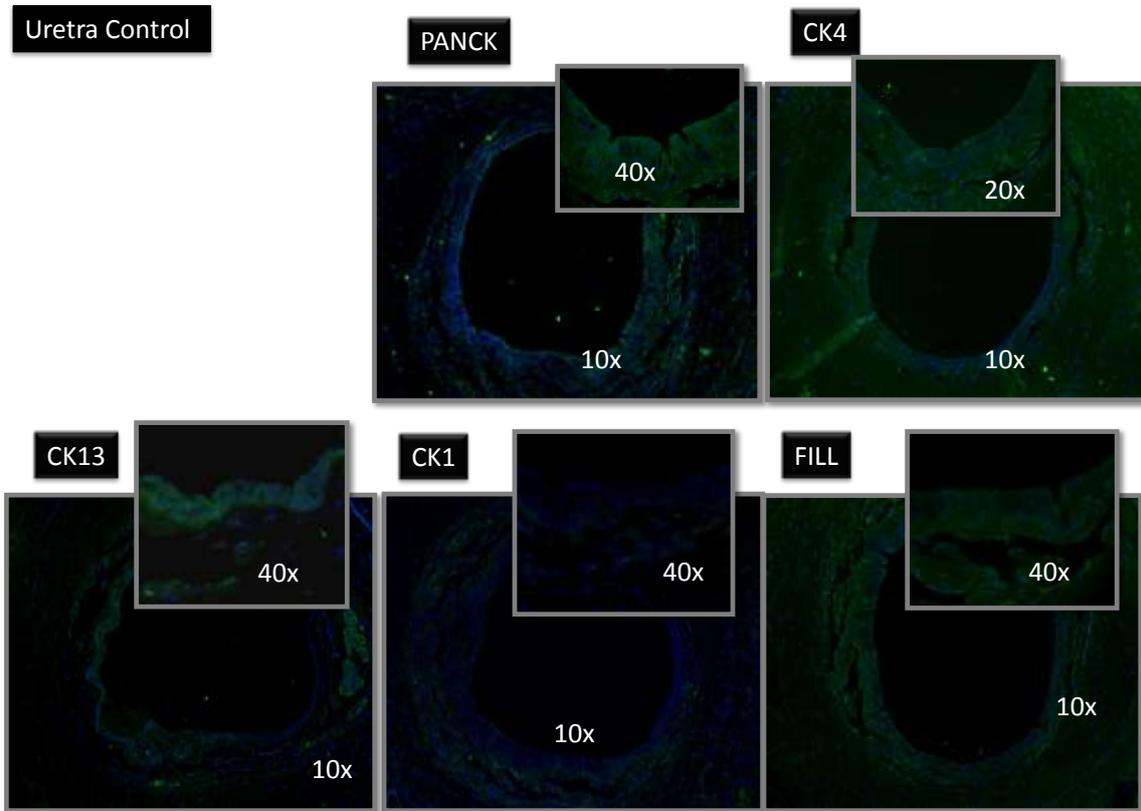


Figura 51. Expresión de citoquertinas en urotelio.

En lo que respecta al análisis de los **tejidos injertados** a nivel uretral, a los **10 días postimplante** la expresión de pancitoqueratina es positiva en el epitelio injertado, pero no se observó expresión de CK4 ni de filagrina. La CK 13 fue levemente positiva, sobre todo en la capa superficial, y la CK 1 mostró expresión fuertemente positiva en todas las capas. (Figura 52).

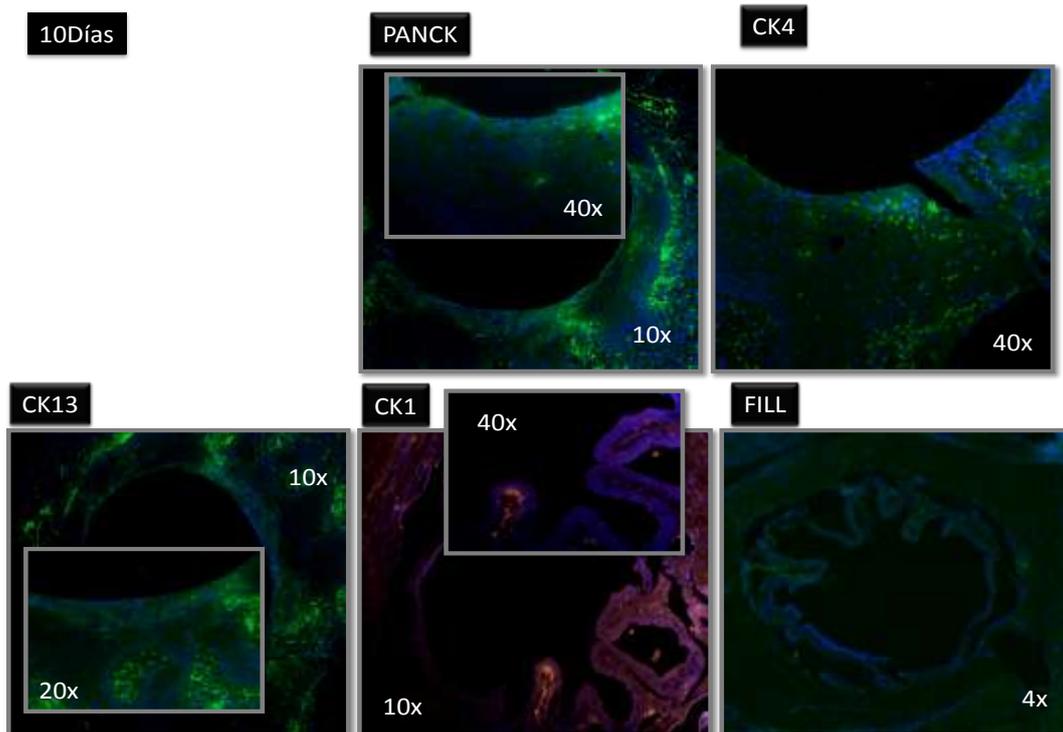


Figura 52. Expresión de citoqueratinas a los diez días del implante.

El análisis de las muestras a los **20 días postimplante** mostró nula expresión de CK4, CK13 y Filagrina, con una expresión positiva de Pancitoqueratina y muy positiva de CK1 (Figura 53).

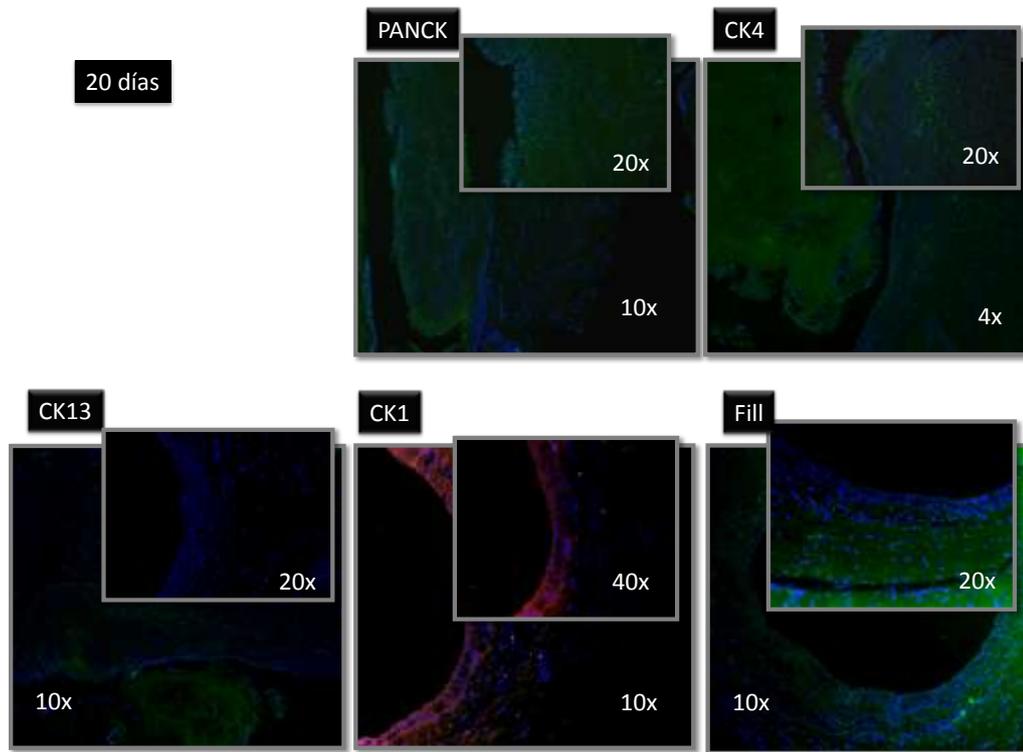


Figura 53. Expresión de marcadores epiteliales a los 20 días del implante.

A los **30 días postimplante** se observó un cambio considerable con respecto a las muestras previas de 10 y 20 días, con positividad en todas las citoqueratinas. Expresión positiva para CK 13, muy positiva para Pancitoqueratina en todas las capas, también muy positiva en la capa superficial para CK4 y Filagrina y fuertemente positiva para CK1 en la capa superficial (Figura 54).

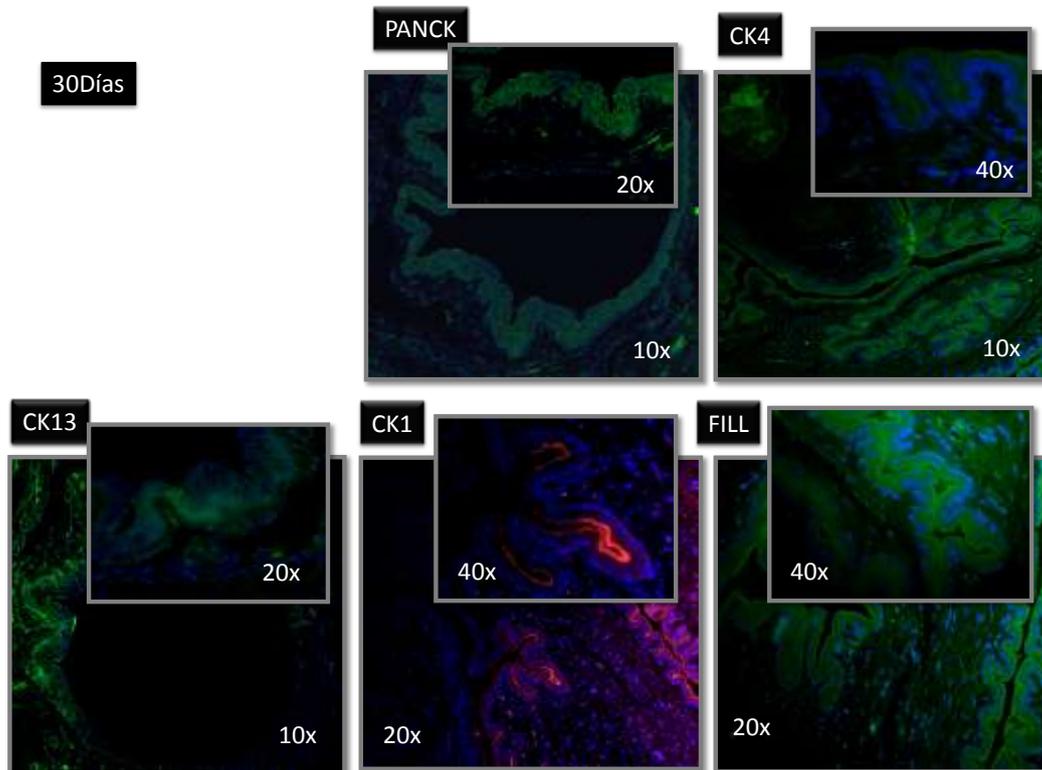


Figura 54. Expresión de marcadores epiteliales a los 30 días del implante.

En el análisis de las muestras a los **40 días postimplante** observamos expresión positiva de Pancitoqueratina en todas las capas, levemente positiva de CK13 y Filagrina; expresión positiva de CK1 sólo en la capa superficial y fuertemente positiva de CK4 en la capa superficial (Figura 55).

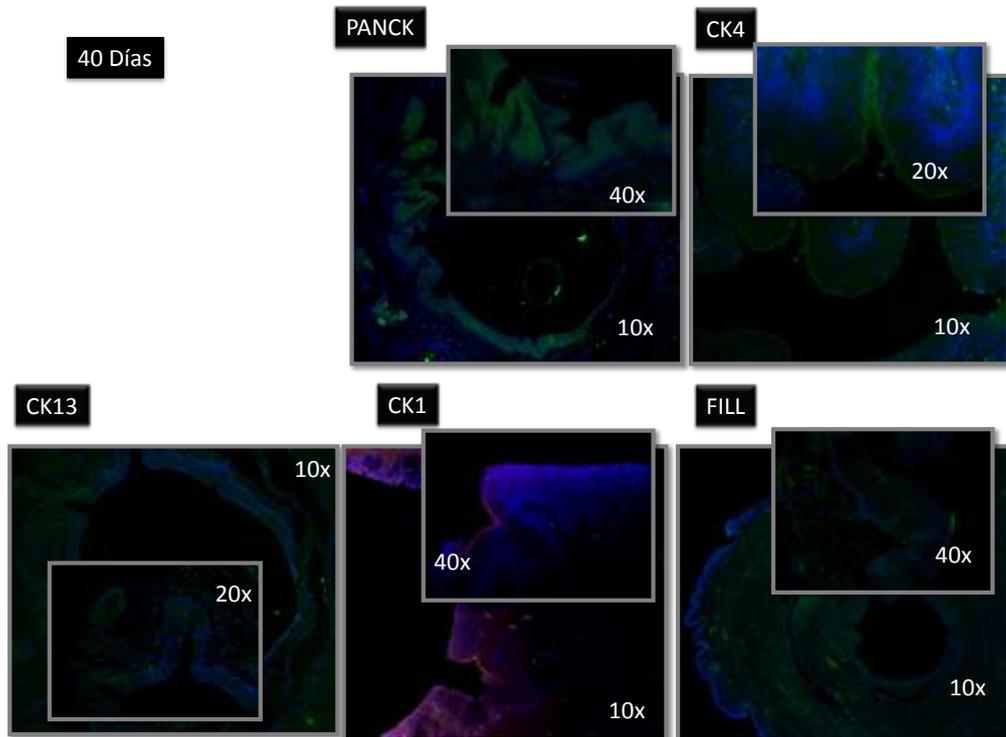


Figura 55. Expresión de marcadores epiteliales a los 40 días del implante.

A los 50 días postimplante se observó una expresividad muy similar en todas las citoqueratinas, levemente positiva para Pancitoqueratina, CK4, CK13 y Filagrina, y expresión positiva de CK1 superficial (Figura 56).

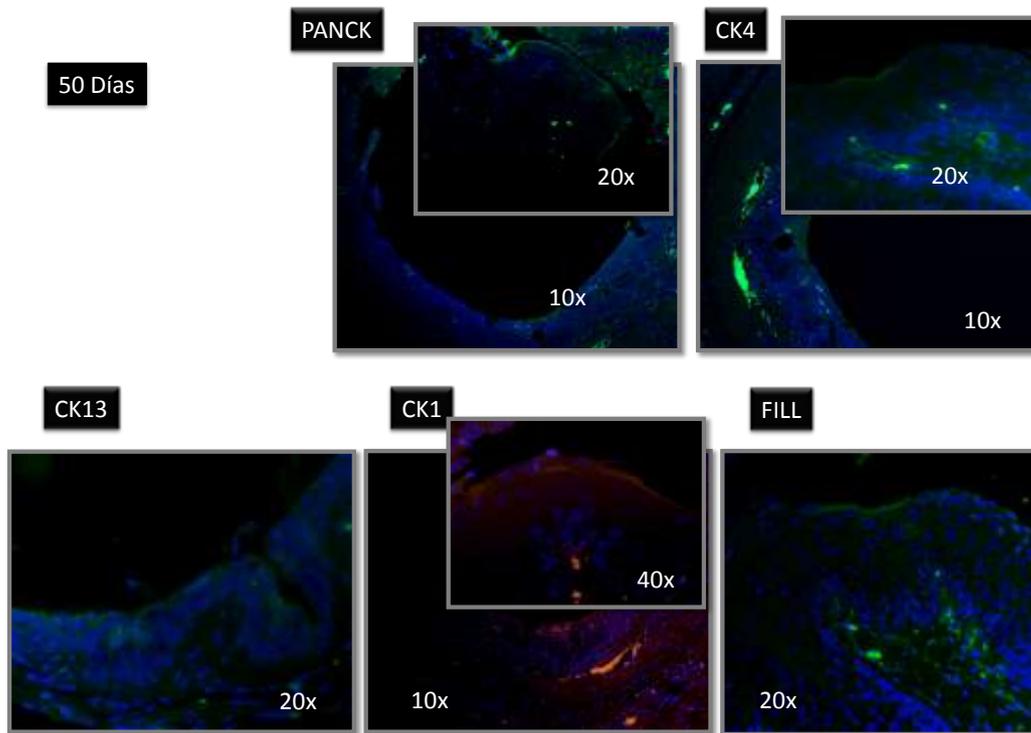


Figura 56. Expresión de marcadores epiteliales a los 50 días del implante.

A los **60 días postimplante** encontramos expresividad nula de CK 4 y filagrina, levemente positiva de CK 13 y pancitoqueratina y positiva de CK 1 (Figura 57).

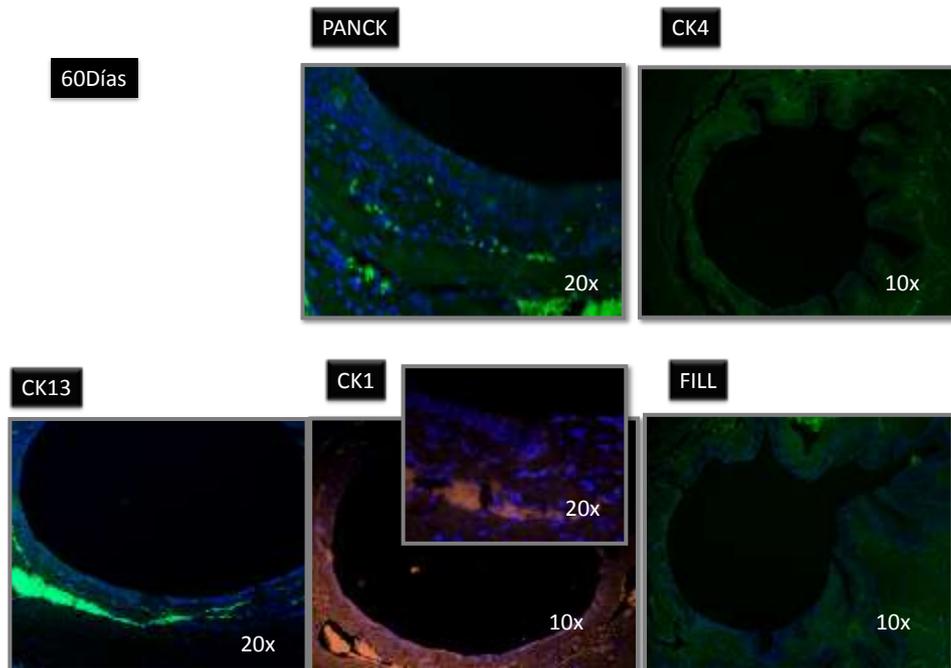


Figura 57. Expresión de marcadores epiteliales a los 60 días del implante.

A los **90 y 120 días postimplante** la expresión de citoqueratinas es prácticamente similar a la de la uretra control, observamos nula expresión de CK1 y Filagrina y expresión levemente positiva de Pancitoqueratina, CK4, CK13 (Figura 58 y Figura 59). La diferencia en expresividad con la uretra control está en la CK 13, que se manifiesta claramente positiva en la uretra control, creemos que con mayor tiempo de seguimiento, la expresión de este marcador, al igual que ha ocurrido con el resto, aparecería similar al urotelio control.

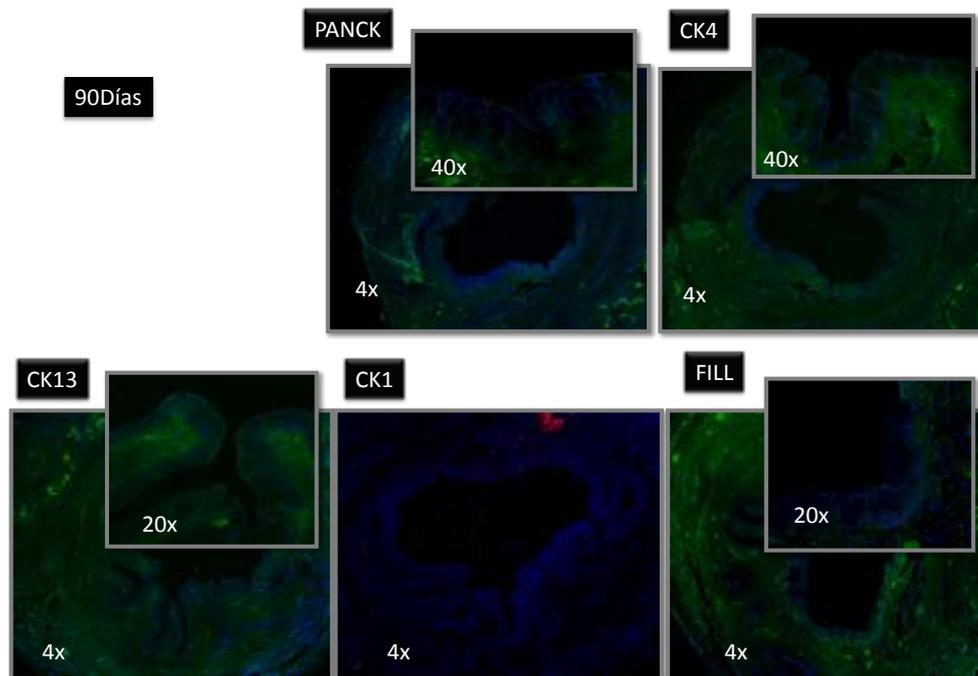


Figura 58. Expresión de marcadores epiteliales a los 90 días del implante

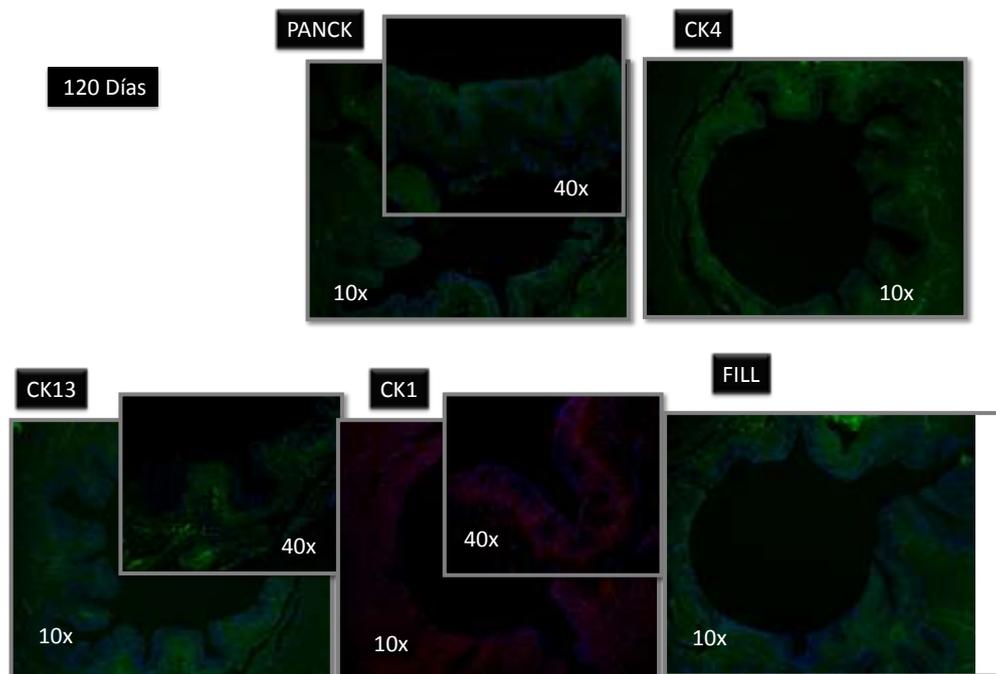


Figura 59. Expresión de marcadores epiteliales a los 120 días del implante.

A continuación se muestra una tabla resumen de la expresión de marcadores epiteliales manifestada en las muestras analizadas en los distintos tiempos postimplante de mucosa oral (Tabla 2).

Tiempo postintervención	Pancitoqueratina	CK4	CK13	CK1	Fill
10 Días	+	-	+/-	++	-
20 Días	+	-	-	++	-
30 Días	++	++	+	+++	+++
40 Días	+	++	+/-	+	+/-
50 Días	+/-	+/-	+/-	+	+/-
60 Días	+/-	+/-	+/-	-	-
90 Días	+/-	+/-	+/-	-	-
120 Días	+/-	+/-	+/-	-	-
Uretra control	+	+/-	++	-	-
Mucosa oral control	++	+++	+++	+++	+++

**Tabla 2.** Evolución de la expresión de marcadores en el implante de mucosa oral con el paso del tiempo.

## 5. DISCUSIÓN

La patología uretral es muy amplia, y la búsqueda de un sustituto ideal de la uretra, ha permitido la descripción de múltiples técnicas quirúrgicas y la realización de una amplia investigación en el empleo de diferentes tejidos tales como mucosa oral, mucosa vesical, piel, e incluso vasos sanguíneos para su reconstrucción.

La mucosa oral ha sido utilizada para la reparación de diferentes tipos de defectos anatómicos uretrales congénitos y adquiridos (Castanon y cols. 1999). En concreto, la utilización de injertos de mucosa oral es una técnica descrita en la literatura para la reconstrucción de la uretra (Belman AB 1993), así como para el cierre de distintos tipos de defectos de la lengua (Bianchi y cols. 2009), la mejilla (Park) y la conjuntiva ocular (Ito y cols. 2007; Li y cols. 2007).

La primera técnica descrita para la reconstrucción uretral mediante injertos de mucosa oral fue la uretroplastia de Humby en 1941 (Humby 1941). Esta técnica presentó numerosos problemas y complicaciones, por lo que dejó de utilizarse. Posteriormente, el grupo de Duckett utiliza de nuevo la mucosa oral para reemplazar la porción media de la uretra en el tiempo peneano de la cirugía del complejo extrofia vesical – epispadias, con resultados prometedores (Duckett y cols. 1995). Unos años

más tarde, Burger recurre a los injertos orales para la reparación uretral en niños afectados de hipospadias, tanto para la reconstrucción de la uretra completa como para la ampliación uretral mediante parches de mucosa oral (Ahmed Sand Guugh 1997). Sin embargo, sería a partir de los trabajos de Dessanti cuando se extendería el uso de la mucosa oral en el tratamiento del hipospadias medio y proximal, así como en el manejo de sus complicaciones (Dessanti y cols. 1992; Dessanti y cols. 1995).

Aunque los injertos de mucosa oral se utilizan con mucha frecuencia para la reconstrucción uretral, se conoce poco sobre el mecanismo por el que se produce la biointegración del injerto y los cambios que acontecen a nivel histológico e inmunohistoquímico. Por este motivo nos hemos planteado este estudio en el que analizamos las modificaciones en la expresión de citoqueratinas y marcadores de diferenciación tisular en el epitelio de la mucosa oral injertada en un defecto uretral.

Por tanto en esta tesis doctoral nos planteamos realizar un análisis secuencial de los animales, a los que se realizó uretroplastia con mucosa oral autóloga. El procedimiento quirúrgico, llevado a cabo bajo anestesia general, es técnicamente sencillo, nos permite en una misma intervención tomar el injerto de la cavidad bucal de la rata y colocarlo en un defecto provocado en la zona media uretral del animal. Similares procedimientos se han llevado a cabo en otros trabajos (El-Sherbiny y cols. 2002; Souza y cols. 2008) aunque con distinto animal de experimentación, en estos casos conejo y perro.

Es ampliamente aceptado, en base a estudios experimentales, que el grosor de la lámina propia, y específicamente el grado de vascularización de la zona donante y receptora, influyen en las posibilidades de que el injerto prenda. Sin embargo, la viabilidad de un injerto depende fundamentalmente de la neovascularización. En nuestro estudio la mucosa oral mostró buena formación de neovascularización desde los 10 días tras la cirugía.

Existen trabajos recientes en humanos, que describen los cambios histológicos que aparecen en pacientes a los que se realizó injerto de mucosa oral para reconstrucción uretral en dos tiempos (cirugía de Bracca) (Mokhless y cols. 2007). Los resultados del análisis histológico de injertos de mucosa oral analizados a los 6 meses

tras intervención mostraron mínimos cambios reactivos en forma de acantosis, hiperplasia epitelial y queratosis focal mínimas, con leve elongación de las papilas de la lámina propia. La lámina propia también estaba levemente edematosa, mostrando mínima infiltración inflamatoria por células mononucleares. Todos los injertos desarrollaron una perfecta vascularización de forma similar a la mucosa oral original.

Se han publicado algunos estudios experimentales en modelos animales. En 2002, El-Sherbiny et al. (El-Sherbiny y cols. 2002) publicaron un trabajo en el que se utilizó un modelo animal en perros para comparar las características funcionales y patológicas de 3 tipos de materiales para reconstrucción uretral usados como injerto (mucosa oral, mucosa vesical y piel de espesor total). Los injertos de mucosa oral se asociaron a un índice menor de complicaciones (12%), seguidos por la mucosa vesical (37%) y los injertos de piel (62%), demostrando las ventajas hasta entonces descritas teóricamente de los injertos de mucosa oral.

También existe publicado un estudio de uretroplastias con mucosa oral en conejos en el que se analizan cambios histológicos acontecidos en la zona receptora (Souza y cols. 2008), en este trabajo se concluye que existe una integración completa del epitelio escamoso con el urotelio, manteniendo las características histológicas del injerto sin fibrosis ni retracción; éstos datos pertenecen a análisis realizados 6 semanas tras la intervención. El seguimiento realizado en nuestro estudio es mayor, llegando hasta la semana 16. Los resultados obtenidos de nuestro análisis histológico coinciden parcialmente con los encontrados en el trabajo anteriormente mencionado, observando en la muestra analizada a los 50 días postimplante (aproximadamente 6 semanas, similar al período de seguimiento del estudio anterior) características histológicas de mucosa oral, con escasa reacción inflamatoria, un epitelio estratificado, pero con menor número de capas que la mucosa oral nativa.

En nuestro trabajo, el tiempo mayor de seguimiento es de 4 meses, y los análisis histológicos nos muestran una integración completa del injerto de mucosa oral, con un estroma bien estructurado, sin importantes signos inflamatorios alrededor, con un epitelio pseudoestratificado similar a la mucosa uretral control.

En nuestro conocimiento el presente estudio experimental es el primero en describir los cambios histopatológicos y de expresión de marcadores epiteliales en uretroplastias con mucosa oral en ratas.

Filipas et al. (Filipas y cols. 1999) publican el resultado del análisis histológico e inmunohistoquímico de injertos de piel y mucosa oral en vejiga en un modelo animal en cerdos. Analizaron las características inmunohistoquímicas 7 meses tras el injerto. Observaron que se expresaba en la zona del injerto de mucosa oral la CK20, que es típica del urotelio vesical, y no de la mucosa oral, y expresión de CK 10, 13 y 19, característica de ambos epitelios. Concluyen que el injerto de mucosa oral muestra significativamente menos hallazgos patológicos tras largo tiempo expuesto a la orina que los injertos de piel total, y por tanto lo indican como material preferible para reconstrucción de la vía urinaria. En nuestro trabajo hemos analizado las características inmunohistoquímicas del injerto en uretra, y al igual que ocurre cuando se injerta en vejiga, el tejido va modificando la expresión de citoqueratinas, perdiendo progresivamente expresión de aquellas típicas de mucosa oral y manifestando las de uretra.

En esta tesis doctoral, los animales fueron sacrificados y las muestras analizadas a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 días postoperatorios, ya que consideramos este intervalo de tiempo como suficiente para proporcionar un adecuado tiempo de cicatrización e integración del injerto.

En los resultados obtenidos tras el análisis histológico de las muestras observamos que se produce un cambio progresivo en la morfología del epitelio injertado, pasando de ser estratificado a pseudoestratificado, a partir de los 90 días postimplante. Asimismo desde los primeros 10 días, se observan adecuados niveles de integración en todas sus capas, con un estroma rico en fibras de colágena y fibroblastos y abundantes vasos sanguíneos, como sabemos, dato fundamental para la adecuada integración del injerto. Progresivamente va desapareciendo la leve reacción inflamatoria inicial, apareciendo una integración completa.

Con respecto a la expresión de marcadores epiteliales, hemos observado un cambio secuencial en el patrón de expresión, presentando las primeras muestras

analizadas a los 10 días una expresión fuertemente positiva de CK1, típica de la mucosa oral y los epitelios queratinizados; expresión positiva de pancitoqueratina, levemente positiva de CK13 y nula expresión de CK4 y filagrina. Todo ello sugiere que los tejidos orales mantienen su fenotipo durante los primeros días postimplante.

A los 20 días, encontramos nula expresión de CK4, 13, hecho llamativo, puesto que ambas CK son típicas tanto de epitelio oral como uretral, y que podría relacionarse con el proceso adaptativo del injerto a su nuevo ambiente tisular. Además, existió nula expresión de filagrina, y expresión positiva de CK1 y pancitoqueratina lo cual revela su naturaleza oral.

Al analizar las muestras a los 30 días, observamos un patrón de expresión similar al de la mucosa oral control, fuertemente positiva para pancitoqueratina, CK4, CK1 y filagrina. Es a partir de este momento cuando comienza a observarse un cambio evidente; así en las muestras analizadas a los 40 y 50 días postimplante, existe expresividad levemente positiva de CK 1, 4, 13, pancitoqueratina y filagrina; se expresan tanto las correspondientes a uretra como a mucosa oral, pero con una expresión levemente positiva, no característica de ninguno de los dos epitelios, todo ello sugiere que los tejidos orales implantados durante 40-50 días podrían tener niveles de diferenciación intermedios entre el epitelio estratificado oral y el epitelio pseudoestratificado uretral.

La expresión a los 60, 90 y 120 días postimplante es similar a la uretra control, con expresión positiva de pancitoqueratina y levemente positiva de CK 4 y 13, sin evidencia de expresión de CK 1 y filagrina, propias de los epitelios estratificados queratinizados. Estos datos nos muestran que se ha producido un cambio en la expresión de los principales marcadores epiteliales del epitelio injertado. Tras un tiempo de exposición al ambiente del tracto uretral, considerando el microambiente del estroma circundante en toda la zona basal del injerto y la luz uretral con el paso de orina durante cada micción del animal, progresivamente se expresan las características del epitelio uretral, tanto histológicas, como inmunohistoquímicas.

De estos datos deducimos que se ha producido un proceso de transdiferenciación. Existen células adultas maduras que tienen capacidad de

diferenciarse a una célula de otro linaje sin que éstas tengan que revertir a célula troncal o progenitora (Tsai y cols. 2002; Thowfeequ y cols. 2007). A esta capacidad de diferenciación se le ha llamado transdiferenciación celular. La transdiferenciación de una célula madura a otra célula diferenciada puede deberse a:

- Una mutación en la secuencia de nucleótidos del ADN.
- Alteraciones epigenéticas, es decir, cambios que ocurren a nivel del genoma que no se deben a modificaciones de la secuencia de nucleótidos, sino a modificaciones en el patrón de expresión génica por procesos de metilación o acetilación del ADN entre otros.
- Otros factores ambientales que intervienen en los cambios que se producen en la expresión génica (Thowfeequ y cols. 2007).

Éste fenómeno, la transdiferenciación celular está en contraste con el proceso de diferenciación, el cual involucra una serie de etapas mediante las cuales una célula inmadura o indiferenciada modifica su fenotipo y su morfología para convertirse en una célula adulta madura (célula diferenciada). De esa manera, la célula podrá alcanzar una estructura y función especializada.

Inducir la transdiferenciación de células diferenciadas con un fin terapéutico puede ser importante en la Medicina Regenerativa ya que se evitarían los problemas éticos y oncológicos que presentan las células embrionarias, y por otro lado, la dificultad para obtener células troncales adultas.

Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se describe el proceso de diferenciación pluripotencial de células madre derivadas del estroma del tejido adiposo adulto (Nieto-Aguilar y cols.) en las que tras su cultivo, se ha conseguido la inducción a la diferenciación de células adultas de hueso, cartílago, tejido adiposo y tejido neuronal. Para inducir la diferenciación a cada una de las estirpes celulares se han usado medios de cultivo específicos. Después se ha realizado un estudio histológico y genético comprobando las características de las células inducidas en el proceso de diferenciación.

Pero también es posible llevar a cabo este proceso de una célula adulta a otra célula adulta de una estirpe diferente, como demuestra el trabajo publicado por Liu et al. (Liu y cols.), en el que a partir de células mononucleares de sangre periférica pueden inducir, gracias a medios de cultivo específicos, la transdiferenciación a células precursoras neuronales y células progenitoras retinianas in vitro, y además, éstas células diferenciadas pueden migrar e integrarse en la retina in vivo.

Al exponer las células de sangre periférica a medios específicos de cultivo de tejido retiniano se consigue la transdiferenciación a éstas estirpes celulares. Esta capacidad de transdiferenciación inducida por el medio ambiente es lo que consideramos que se ha producido en nuestro estudio, ya que al injertar la mucosa oral en la uretra, el estroma circundante ha favorecido el crecimiento y la maduración hacia epitelio uretral, cambiando las características morfológicas e inmunohistoquímicas del epitelio oral nativo. En este proceso es fundamental el intercambio de información entre el epitelio y el estroma subyacente, habiéndose descrito la importancia de la interacción epitelio-mesénquima para el correcto desarrollo del epitelio en un tejido concreto.

Todos los resultados hallados en este trabajo sugieren que la mucosa oral es un buen tejido sustitutivo de la uretra en todos los casos en que existan defectos congénitos o adquiridos de la misma.

La mucosa oral sufre un proceso de integración, sin generar complicaciones locales (estenosis, fístulas, retracción, dehiscencia ni rechazo del injerto). Además no sufre alteraciones ultraestructurales que puedan originar formaciones degenerativas o tumorales.

La zona donante no sufre complicaciones, es un tejido accesible, de fácil manipulación. En humanos están descritas complicaciones locales en la zona donante, que han originado secuelas en los pacientes, como entumecimiento de la lengua, parageusias, opresión en la boca y dificultades en el habla (Xu y cols. ; Dublin y cols. 2004; Canning 2005), aunque la mayoría de las complicaciones disminuyen progresivamente a lo largo del primer año de seguimiento. (Xu y cols.) En nuestro trabajo los animales no han presentado complicaciones de ningún tipo en la zona

donante, permitiendo una alimentación adecuada, con ausencia de cicatrización anómala. Sin embargo es importante recordar que el modelo animal no es totalmente extrapolable al humano debido a las diferencias biológicas.

Podemos decir que el tejido oral, una vez implantado en la uretra es capaz de transdiferenciarse y adaptarse al medio ambiente urinario que es muy distinto al de la boca, distinto pH, composición enzimática, y agresiones físicas o mecánicas. Esta transdiferenciación ocurre en el modelo animal a partir de los 90 días a nivel estructural, y a nivel funcional a partir de los 60 días, salvo la CK 13 que no llega a alcanzar los niveles de expresión de la uretra control durante el periodo de seguimiento de este estudio.

Sería preciso llevar a cabo estudios a más largo plazo en experimentación animal y estudiar las posibles modificaciones genéticas que pudieran aparecer con el paso del tiempo. Realizar estudios similares en humanos sería interesante, pero existen limitaciones de participación de individuos por cuestiones éticas.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones.

1.- En esta tesis doctoral hemos descrito una técnica para la sustitución parcial de la uretra de rata por mucosa oral que ha sido factible, fácil de llevar a cabo sin que presente prácticamente complicaciones, y que nos ha permitido evaluar las modificaciones que se producen en los injertos de mucosa oral a nivel uretral.

2.- La funcionalidad de la uretra de rata en la que se ha implantado un injerto de mucosa oral autóloga ha sido excelente, casi exenta de complicaciones, siendo la micción normal y macroscópicamente sin alteraciones morfológicas en la anatomía peneana. No hubo tampoco complicaciones en la zona donante, sin retracciones, cicatrización anómala ni dificultades en la alimentación.

3.- La adaptación del injerto a la zona donante es tal que la integración es completa y las características estructurales evaluadas por análisis histológico van cambiando progresivamente. El epitelio estratificado pasa a ser pseudoestratificado a partir de los 90 días postinjerto. Desde los primeros 10 días se observan adecuados niveles de integración, con un estroma rico en fibras de colágena y fibroblastos y

abundantes vasos sanguíneos. Progresivamente va desapareciendo la leve reacción inflamatoria inicial, apareciendo una integración completa, además la mucosa oral no sufre alteraciones ultraestructurales que originen formaciones degenerativas o tumorales. De modo que desaparecen las características propias de la zona donante (mucosa oral) y aparecen las típicas de la zona receptora (uretra).

4.- Las características funcionales evaluadas por la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratinas y filagrina) nos indican que se produce un cambio progresivo, a partir de los 60 días la expresividad de los mismos es prácticamente similar a la hallada en la uretra nativa, encontrando como única diferencia una menor intensidad en expresividad de CK 13; sin evidencia de expresión de marcadores típicos de la zona donante. Podemos decir que la mucosa oral, tras un periodo de exposición al medio ambiente urinario, partiendo de células adultas con un epitelio estratificado, se origina un epitelio pseudoestratificado, y sufre un proceso de transdiferenciación a mucosa uretral.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Achtstatter, T., R. Moll, B. Moore, W. W. Franke (1985). "Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies." J Histochem Cytochem **33**(5): 415-26.
- Ahmed Sand Guugh, D. (1997). "Buccal mucosal graft for secondary hypospadias repair and urethral replacement." **80**(2): 328-330.
- Ahmed T. Hadidi, A. F. A. ( 2004). Grafts for One-Stage Repair. Hypospadias surgery: an illustrated guide. Springer. Heidelberg, Springer-verlag. **1**: 217-223.
- Alaminos, M., I. Garzon, M. C. Sanchez-Quevedo, G. Moreu, M. Gonzalez-Andrades, A. Fernandez-Montoya, A. Campos (2007). "Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa." J Tissue Eng Regen Med **1**(5): 350-9.
- Albers, K., E. Fuchs (1992). "The molecular biology of intermediate filament proteins." Int Rev Cytol **134**: 243-79.
- Belman AB, E.-K. A., Noweir AM, El-Halaby MR, Zakaria W, El-Beialy MH (1993). "The use of buccal mucosa patch graft in the management of anterior urethral structures." J Urol **149**: 276-278.
- Bhargava, S., C. R. Chapple (2004). "Buccal mucosal urethroplasty: is it the new gold standard?" BJU Int **93**(9): 1191-3.

- Bianchi, B., A. Ferri, S. Ferrari, C. Copelli, E. Sesenna (2009). "Myomucosal cheek flaps: applications in intraoral reconstruction using three different techniques." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **108**(3): 353-9.
- Burger, R. A., S. C. Muller, H. el-Damanhoury, A. Tschakaloff, H. Riedmiller, R. Hohenfellner (1992). "The buccal mucosal graft for urethral reconstruction: a preliminary report." J Urol **147**(3): 662-4.
- Canning, D. A. (2005). "Oral complications after buccal mucosal graft harvest for urethroplasty." J Urol **173**(6): 2145.
- Castanon, M., C. Grande, M. E. Munoz, A. Garcia, L. Morales (1999). "[Treatment of severe scrotal hypospadias with onlay-type urethroplasty using mouth mucosa]." Cir Pediatr **12**(3): 90-3.
- Clausen, H., D. Moe, K. Buschard, E. Dabelsteen (1986). "Keratin proteins in human oral mucosa." J Oral Pathol **15**(1): 36-42.
- Costea, D. E., L. L. Loro, E. A. Dimba, O. K. Vintermyr, A. C. Johannessen (2003). "Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium." J Invest Dermatol **121**(6): 1479-86.
- D'Armento, G., L. Daniele, S. Mariani, D. Ottaviani, A. Mussa, P. Cassoni, A. Sapino, G. Bussolati (2009). "Added value of combined gene and protein expression of CK20 and CEA in non-macroscopically involved lymph nodes of colorectal cancer." Int J Surg Pathol **17**(2): 93-8.
- Dale, B. A., W. B. Thompson, I. B. Stern (1982). "Distribution of histidine-rich basic protein, a possible keratin matrix protein, in rat oral epithelium." Arch Oral Biol **27**(7): 535-45.
- Dessanti, A., A. Porcu, A. M. Scanu, G. Dettori, G. Caccia (1995). "Labial mucosa and combined labial/bladder mucosa free graft for urethral reconstruction." J Pediatr Surg **30**(11): 1554-6.
- Dessanti, A., W. Rigamonti, V. Merulla, D. Falchetti, G. Caccia (1992). "Autologous buccal mucosa graft for hypospadias repair: an initial report." J Urol **147**(4): 1081-3; discussion 1083-4.
- Donoff, R. B. (1976). "Biological basis for vestibuloplasty procedures." J Oral Surg **34**(10): 890-6.
- Dublin, N., L. H. Stewart (2004). "Oral complications after buccal mucosal graft harvest for urethroplasty." BJU Int **94**(6): 867-9.
- Duckett, J. W., D. Coplen, D. Ewalt, L. S. Baskin (1995). "Buccal mucosal urethral replacement." J Urol **153**(5): 1660-3.
- el-Kasaby, A. W., M. Fath-Alla, A. M. Noweir, M. R. el-Halaby, W. Zakaria, M. H. el-Beialy (1993). "The use of buccal mucosa patch graft in the management of anterior urethral strictures." J Urol **149**(2): 276-8.
- El-Sherbiny, M. T., H. Abol-Enein, M. S. Dawaba, M. A. Ghoneim (2002). "Treatment of urethral defects: skin, buccal or bladder mucosa, tube or patch? An experimental study in dogs." J Urol **167**(5): 2225-8.

- Fawcett, B. (1995). Tratado de Histología, Mc. Graw-Hill.
- Fernandez-Segura, E., F. J. Canizares, M. A. Cubero, A. Warley, A. Campos (1999). "Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis." Exp Cell Res **253**(2): 454-62.
- Ferraris, M., A. Campos (2002). Histología y Embriología Bucodental Madrid, Panamericana.
- Filipas, D., M. Fisch, J. Fichtner, J. Fitzpatrick, K. Berg, S. Storkel, R. Hohenfellner, J. W. Thuroff (1999). "The histology and immunohistochemistry of free buccal mucosa and full-skin grafts after exposure to urine." BJU Int **84**(1): 108-11.
- Franke, W. W., D. L. Schiller, M. Hatzfeld, S. Winter (1983). "Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(23): 7113-7.
- Fuchs, E. V., S. M. Coppock, H. Green, D. W. Cleveland (1981). "Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance." Cell **27**(1 Pt 2): 75-84.
- Hackney, D. D. (1996). "The kinetic cycles of myosin, kinesin, and dynein." Annu Rev Physiol **58**: 731-50.
- Haydock, P. V., B. A. Dale (1990). "Filaggrin, an intermediate filament-associated protein: structural and functional implications from the sequence of a cDNA from rat." DNA Cell Biol **9**(4): 251-61.
- Heid, H. W., I. Moll, W. W. Franke (1988). "Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum)." Differentiation **37**(3): 215-30.
- HogenEsch, H., D. Boggess, J. P. Sundberg (1999). "Changes in keratin and filaggrin expression in the skin of chronic proliferative dermatitis (cpdm) mutant mice." Pathobiology **67**(1): 45-50.
- Humby, G. (1941). "A one-stage operation for hypospadias." British journal of surgery **29**(113): 84-92.
- Ito, R., M. Fujiwara, R. Nagasako (2007). "Hard palate mucoperiosteal graft for posterior lamellar reconstruction of the upper eyelid: histologic rationale." J Craniofac Surg **18**(3): 684-90.
- Itoiz, M. E., C. J. Conti, H. E. Lanfranchi, M. Mamrack, A. J. Klein-Szanto (1985). "Immunohistochemical detection of filaggrin in preneoplastic and neoplastic lesions of the human oral mucosa." Am J Pathol **119**(3): 456-61.
- Kim, S., P. Wong, P. A. Coulombe (2006). "A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth." Nature **441**(7091): 362-5.
- Kropfl, D., A. Tucak, D. Prlc, A. Verweyen (1998). "Using buccal mucosa for urethral reconstruction in primary and re-operative surgery." Eur Urol **34**(3): 216-20.

- Lee, C. H., P. A. Coulombe (2009). "Self-organization of keratin intermediate filaments into cross-linked networks." J Cell Biol **186**(3): 409-21.
- Leone, C. R., Jr. (1995). "Conjunctivodacryocystorhinostomy with buccal mucosal graft." Arch Ophthalmol **113**(1): 113-5.
- Li, D. M., Y. Qin, T. Chen, Y. Zhao (2007). "[Use of periocular superficial musculo-aponeurotic system flap and hard palate mucosal graft in reconstruction of full-thickness eyelid defects]." Zhonghua Yan Ke Za Zhi **43**(12): 1064-8.
- Lin, W. C., C. Y. Chang, Y. Y. Shen, H. D. Tsai (2003). "Use of autologous buccal mucosa for vaginoplasty: a study of eight cases." Hum Reprod **18**(3): 604-7.
- Liu, Q., L. Guan, B. Huang, W. H. Li, Q. Su, M. Yu, X. P. Xu, T. Luo, S. C. Lin, X. Sun, M. Chen, X. G. Chen "Adult peripheral blood mononuclear cells transdifferentiate in vitro and integrate into the retina in vivo." Cell Biol Int.
- Manzoni GM, R. P. I. E. R., Alter GJ (1999). Buccal mucosa graft for hypospadias. Reconstructive and plastic surgery of the external genitalia: adult and pediatric. Philadelphia, Saunders: 121-125.
- Markiewicz, M. R., M. A. Lukose, J. E. Margarone, 3rd, G. Barbagli, K. S. Miller, S. K. Chuang (2007). "The oral mucosa graft: a systematic review." J Urol **178**(2): 387-94.
- Mokhless, I. A., M. A. Kader, N. Fahmy, M. Youssef (2007). "The multistage use of buccal mucosa grafts for complex hypospadias: histological changes." J Urol **177**(4): 1496-9; discussion 1499-500.
- Moll, R., W. W. Franke, D. L. Schiller, B. Geiger, R. Krepler (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Montenegro, M. A., G. C. Ibarra, M. Rojas (1998). "Cytokeratin expression in human and mouse gingival epithelia." Rev. Chil. Anat. **16**(2): 211-217.
- Nieto-Aguilar, R., D. Serrato, I. Garzon, A. Campos, M. Alaminos "Pluripotential Differentiation Capability of Human Adipose-derived Stem Cells in a Novel Fibrin-agarose Scaffold." J Biomater Appl.
- Paramio, J. M., J. L. Jorcano (2002). "Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling?" Bioessays **24**(9): 836-44.
- Park, J. B. "A two-stage approach using an autogenous masticatory mucosal graft and an autogenous connective tissue graft to treat gingival recession: a case report." J Int Acad Periodontol **12**(2): 45-8.
- Patterson, J. M., C. R. Chapple (2008). "Surgical techniques in substitution urethroplasty using buccal mucosa for the treatment of anterior urethral strictures." Eur Urol **53**(6): 1162-71.
- Petzoldt, J. L., I. M. Leigh, P. G. Duffy, J. R. Masters (1994). "Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro." Urol Res **22**(2): 67-74.

- Raul, U., S. Sawant, P. Dange, R. Kalraiya, A. Ingle, M. Vaidya (2004). "Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype." Int J Cancer **111**(5): 662-8.
- Reynolds, E. S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." J Cell Biol **17**: 208-12.
- Sanchez-Quevedo, M. C., M. Alaminos, L. M. Capitan, G. Moreu, I. Garzon, P. V. Crespo, A. Campos (2007). "Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering." Histol Histopathol **22**(6): 631-40.
- Sawaf, M. H., J. P. Ouhayoun, N. Forest (1991). "Cytokeratin profiles in oral epithelial: a review and a new classification." J Biol Buccale **19**(3): 187-98.
- Southgate, J., P. Harnden, L. K. Trejdosiewicz (1999). "Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications." Histol Histopathol **14**(2): 657-64.
- Souza, G. F., A. A. Calado, R. Delcelo, V. Ortiz, A. Macedo, Jr. (2008). "Histopathological evaluation of urethroplasty with dorsal buccal mucosa: an experimental study in rabbits." Int Braz J Urol **34**(3): 345-51; discussion 351-4.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi, P. Burkhard (2002). "Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly." EMBO J **21**(6): 1255-66.
- Sun, T. T., T. I. Doran, A. Vidrich (1980). "The use of antikeratin antibodies for the identification of cultured epithelial cells." Birth Defects Orig Artic Ser **16**(2): 183-96.
- Thowfeequ, S., E. J. Myatt, D. Tosh (2007). "Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy." Dev Dyn **236**(12): 3208-17.
- Tsai, R. Y., R. Kittappa, R. D. McKay (2002). "Plasticity, niches, and the use of stem cells." Dev Cell **2**(6): 707-12.
- Tseng, S. C., M. J. Jarvinen, W. G. Nelson, J. W. Huang, J. Woodcock-Mitchell, T. T. Sun (1982). "Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies." Cell **30**(2): 361-72.
- Van der Velden, L. A., J. J. Manni, F. C. Ramaekers, W. Kuijpers (1999). "Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa." Eur Arch Otorhinolaryngol **256**(10): 514-9.
- Venn, S. N., A. R. Mundy (1998). "Early experience with the use of buccal mucosa for substitution urethroplasty." Br J Urol **81**(5): 738-40.
- Watanabe, K., A. Ogawa, M. Kiyono (1995). "Reconstruction of the urethral meatus with a buccal mucosa graft." Urol Int **55**(1): 29-31.
- Xu, Y. M., Q. K. Xu, Q. Fu, Y. L. Sa, J. Zhang, L. J. Song, X. Y. Hu, C. Li "Oral complications after lingual mucosal graft harvesting for urethroplasty in 110 cases." BJU Int.

Yarington, C. T., Jr. (1980). "Reconstruction of the base of the tongue and lateral pharyngeal wall." Laryngoscope **90**(2): 202-6.