



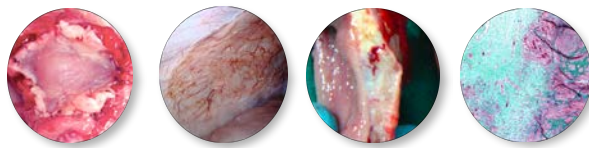
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

USO DE UNA MATRIZ DE COLÁGENO Y ELASTINA EN LA REPARACIÓN DE UN DEFECTO VESICAL CON PERITONEO PARIETAL EN MODELO PORCINO



Autor: **Carlos Gasanz**

Directores: **Juan Morote, Carles Raventós**

**Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina**

Barcelona, 2018



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**USO DE UNA MATRIZ DE COLÁGENO Y ELASTINA EN LA
REPARACIÓN DE UN DEFECTO VESICAL
CON PERITONEO PARIETAL EN MODELO PORCINO**

TESIS DOCTORAL

Autor: Carlos Gasanz

Director y tutor: Prof. Dr. Juan Morote

Codirector: Dr. Carles Raventós

Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina

Barcelona, 2018

A mis padres y a la Dani

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la participación directa o indirecta de muchas personas. El trabajo propiamente experimental fue realizado íntegramente durante los tres últimos años del periodo de formación como especialista en Urología. Quiero agradecer a mis compañeros de residencia su participación en este proyecto, que hizo que adquiriera más importancia y me motivara a finalizarlo. Ellos son (por antigüedad): F. Ágreda, I. Iztueta, C. Konstantinidis, C. Isalt, L. Regis, P. Servián, R. López del Campo, I. Arroyo, M. Cuadras y E. Miret.

A Carles Raventós le agradezco su propuesta de realizar este trabajo doctoral, su idea de realizar cirugía reconstructiva vesical con biomateriales, su ayuda para buscar la financiación necesaria y tutorizarme en las primeras cirugías.

A Marielle Esteves y Carla Fonseca, veterinarias del estabulario, les estoy agradecido por haberme ayudado a realizar las cirugías (incluso en ocasiones como asistentes), anestesiado y cuidado de los animales operados. Las aportaciones que han hecho al proyecto y el apoyo personal que he recibido de ellas durante estos años ha sido muy valioso.

A Juan Morote quiero darle las gracias por haberme motivado a escribir esta tesis y los artículos científicos derivados. Su dirección ha sido fundamental para plasmar por escrito el trabajo experimental realizado.

Quiero acordarme de mis padres y de mi tía M^a Carmen, quienes me inculcaron el hábito del trabajo y del estudio. Su apoyo y motivación hacia lo académico ha sido determinante.

Y por último dar las gracias a Daniela, por estar siempre ahí.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Resumen	11
Summary	13
Introducción	15
1. El uso del intestino como sustituto vesical	17
2. Generalidades sobre biomateriales y cultivos celulares	18
3. Generalidades sobre la anatomía e histología del peritoneo	20
4. Estado de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción vesical	21
5. Motivación	24
Artículo de revisión	27
Hipótesis y objetivos	37
Metodología	43
Resultados	49
Artículo original	51
Discusión	61
Conclusiones	67
Bibliografía	71
Anexos	79

ABREVIATURAS

ASC	Adipose Stem Cells
Ch	Charrière
GAG	Glucosaminoglicanos
HFSC	Hair Follicle Stem Cells
H&E	Hematoxilina y eosina
H-score	Histoscore
IV	Intravenoso
MSC	Mesenchymal Stromal Cells
p	p-valor
PGA	Ácido poliglicólico
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses

RESUMEN

La reconstrucción vesical es el procedimiento realizado para sustituir o ampliar la vejiga, siendo el intestino el tejido utilizado en la práctica clínica habitual. A pesar de que su uso no está exento de complicaciones, apenas hay estudios clínicos en humanos que realicen reconstrucciones vesicales con materiales distintos al intestinal. Esta tesis -apoyada por dos artículos- quiere contribuir al desarrollo e investigación de un material que pueda reemplazar al intestino como *gold standard* de sustituto vesical.

El **artículo de revisión** pretende describir y clasificar los diferentes materiales y cultivos celulares utilizados en ingeniería tisular vesical, así como revisar los estudios realizados en humanos. Tras la revisión de la literatura publicada, concluimos que la aproximación más realista para realizar una reconstrucción vesical experimental sería utilizar una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirle *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas, y/o células madre.

El **artículo original** está basado en un proyecto experimental, en modelo porcino, en el que se realizaron ampliaciones vesicales utilizando un injerto de peritoneo parietal y se determinó si la adición de una matriz de colágeno y elastina reportaba mejores resultados histológicos y funcionales. Tras 6 semanas, los datos sugieren que la utilización de este tipo de biomaterial en un modelo porcino de peritoneocistoplastia favorece la regeneración tisular de la nueva pared.

La sustitución o ampliación vesical sin utilizar el intestino continúa siendo un reto a día de hoy a pesar del progreso en la fabricación de biomateriales y del desarrollo de cultivos celulares. Para plantear una traslación clínica efectiva será necesario en el futuro realizar estudios bien diseñados, con mayor número de pacientes incluidos, más tiempo de seguimiento y estandarizar las pruebas funcionales de control.

SUMMARY

Bladder reconstructive surgery consists in creating a substitute or an enlargement to the bladder. Currently, human intestine is the tissue used into clinical practice to make it possible although it has many relevant drawbacks. Human bladder engineering with other materials is merely anecdotic, and mostly *in vitro* and animal studies have been conducted. This thesis - supported by two articles- works towards the research of a material that could replace the intestine as the gold standard tissue for bladder reconstruction.

The aim of the **review article** was to describe and classify the different biomaterials and explain the human clinical studies done so far. We concluded that if we had to choose an experimental method to perform a bladder reconstruction, current evidence suggests to opt for an acellular matrix or a synthetic polymer, and seed it with autologous urothelial cells, autologous smooth muscle cells and/or stem cells.

The **original article** consisted of an experimental project conducted in a porcine model, in which we performed bladder augmentations using an autologous parietal peritoneum graft and determined whether the attachment or not of an acellular collagen–elastin matrix had better histologic and functional results. After six weeks, our data supports the benefit of an acellular collagen–elastin matrix to reinforce bladder regeneration in a porcine model of peritoneocystoplasty.

Bladder reconstruction without using the intestine is still an enormous challenge nowadays despite of the improvements in providing new materials and cell cultures. In order to be able to set apart the intestine as the material to substitute the bladder, it is necessary to continue performing more studies, enroll more patients, increase the follow-up time and standardize the functional tests.

INTRODUCCIÓN

1. El uso del intestino como sustituto vesical

La reconstrucción vesical es el procedimiento realizado para sustituir o ampliar la vejiga. La derivación urinaria tras la cistoprostatectomía radical por neoplasia vesical es la indicación más frecuente de reconstrucción [1]. Las causas más habituales que requieren ampliaciones vesicales son la tuberculosis, la cistopatía radica, la cistitis intersticial y algunos tipos de vejigas neurógenas. El intestino es el tejido utilizado en la práctica clínica diaria para realizar una reconstrucción vesical dado que no hay otro material autógeno o heterógeno, natural o artificial, que haya demostrado mejores resultados: ofrecer una buena función estructural, preservar el tracto urinario superior, mantener la continencia urinaria y promover un vaciado urinario adecuado. Por lo tanto, a día de hoy el tejido intestinal continúa siendo el *gold standard* a pesar de las múltiples complicaciones derivadas de su uso. Éstas van desde las propias de una resección intestinal convencional (íleo paralítico, fallo de sutura, déficit nutricional, diarrea, esteatorrea) hasta las resultantes del contacto continuo de la orina con un tejido no preparado para ello. Estas últimas pueden producir desbalances electrolíticos (acidosis metabólicas hipercloremicas), aparición de neoplasias (especialmente en las zonas de anastomosis), reabsorción por vía portal de algunos fármacos eliminados por la orina cambiando así la toxicidad de éstos (destaca el metotrexato, la fenitoína y el litio) y la formación de litiasis. Mención aparte merecen las complicaciones mecánicas propias del reservorio: complicaciones estomacales, estenosis de la anastomosis ureteroenterica o uretroenterica, aumento no deseado del volumen máximo, residuo postmiccional elevado, incontinencia nocturna (éstas tres últimas en referencia a las neovejigas ortotopicas) [2, 3]. Estas complicaciones comportan un incremento de la morbilidad [4, 5]. Para prevenir los efectos negativos del uso de tejido intestinal como sustituto del urinario y considerando que en algunas reconstrucciones no es posible el uso del intestino (pacientes con enfermedades intestinales

inflamatorias crónicas, síndrome de intestino corto, irradiación abdomino-pélvica, etc), en los años 50 se inició la experimentación con materiales no intestinales [6].

2. Generalidades sobre biomateriales y cultivos celulares

El interés por encontrar un material distinto al intestino para reconstruir la vejiga ha ido creciendo con el paso de los años en paralelo al progreso de la ingeniería tisular. Esta especialidad es de carácter multidisciplinar dado que intervienen en su desarrollo ingenieros de diferentes ámbitos, biólogos, médicos, bioquímicos, biotecnólogos, farmacéuticos, etc. El objetivo es crear un material -natural o artificial- capaz de restaurar la función de un órgano o tejido. A este material a menudo se le denomina genéricamente biomaterial o *scaffold* (andamio). Lo ideal es utilizar un compuesto biodegradable, biocompatible y que pueda funcionar como *scaffold* desde el punto de vista estructural y celular permitiendo así el crecimiento de nuevo tejido sobre éste [7, 8]. Se han realizado múltiples estudios *in vitro* y en modelo animal (perro, conejo, rata y cerdo) pero con escasos trabajos clínicos en humanos pues apenas existen 18 estudios (169 pacientes en total) que hayan realizado reconstrucciones vesicales utilizando biomateriales [9].

Existen diferentes tipos de biomateriales, como son los compuestos derivados de elementos naturales (colágeno, elastina, laminina, fibronectina, alginato, ácido hialurónico, agarosa), las matrices acelulares (submucosa vesical, submucosa de intestino delgado, dermis, vesícula biliar, membrana amniótica), los polímeros sintéticos (ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido polilactico-co-glicólico, policaprolactona) y los derivados de la seda [10, 11]. Entre ellos hay diferencias en cuanto a la fuente a partir de la cual se procesan (diferente origen animal en el caso de los naturales), el proceso de producción, la inmunogenicidad, las características mecánicas y estructurales, la degradabilidad y la posibilidad de contener factores de crecimiento [12]. Se podría

decir que cada investigador puede crear su propio biomaterial de acuerdo a las exigencias clínicas o experimentales, incluyendo en ocasiones el uso de impresoras 3D en el proceso de producción. Además hay que tener en cuenta que un mismo biomaterial puede cambiar su comportamiento dependiendo del animal al que se aplique. Por todo ello, la extrapolación de resultados es difícil y se ha de hacer con precaución [13].

Es importante tener en cuenta que existen dos tipos de abordajes cuando se utilizan biomateriales, pudiendo clasificarse como simple y compuesto [14]. El abordaje simple se refiere a que el material se implanta directamente en el órgano diana sin adherir cultivos celulares. El abordaje compuesto hace referencia a que, previo a la implantación, se realizan cultivos celulares y se adhieren *in vitro* al material. Los cultivos pueden ser de células autógenas o bien de células madre. A priori la mejor opción debería ser el de células autógenas (células uroteliales y musculares lisas del propio individuo) pues no presentan riesgo de respuesta inmunológica. Existen varios supuestos que limitan su uso, por ejemplo en las indicaciones de sustituciones o ampliaciones por razones oncológicas por el riesgo de recurrencia de la neoplasia [15, 16]. El cultivo con células madre y su posterior transferencia al biomaterial también ha sido ensayado en modelos animales [17]. Las células madre adultas no presentarían los problemas éticos de las células madre embrionarias. No presentan riesgo de rechazo inmunológico pero sí de transformación neoplásica (aunque menos que las de origen embrionario), por lo que se ha de tener en cuenta el contexto clínico en el que se utilizan [18–20]. La identificación de la mejor población de células madre para su uso en tejidos urológicos aun está por determinar. En el tracto urinario se ha experimentado con células madre de tipo: mesenquimal (*MSCs: Mesenchymal Stromal Cells*), adiposa (*ASC: Adipose Stem Cells*), de folículo piloso (*HFSC: Hair Follicle Stem Cells*) y derivadas de la membrana amniótica [21]. Dado que no son células autógenas vesicales, pueden tener más predisposición a ser alteradas por la toxicidad de la orina. De todas ellas, las MSCs parecen ser las más prometedoras.

Han sido las más utilizadas hasta ahora, hay protocolos bien establecidos de aislamiento y crecimiento *in vitro*, son seguras en cuanto a ausencia de transformación maligna y se pueden diferenciar en múltiples líneas celulares (por ejemplo, en células musculares lisas y nerviosas presentes en el tracto urinario) [19, 22, 23]. Cabe mencionar otra variante de las células madre, las llamadas "células madre inducidas" (*Human cell reprogramming*). Gracias a las técnicas de transcripción genética, se reprograman células maduras en células madre. En el campo urológico se han llegado a crear células madre inducidas de dos tipos: prostáticas y uroteliales. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse posteriormente a células maduras (próstata, vejiga, uréter) [24].

3. Generalidades sobre la anatomía e histología del peritoneo

El peritoneo es la membrana serosa más extensa del ser humano con una superficie aproximada de 1.8 m², similar a la ocupada por la piel. Se clasifica en parietal y visceral dependiendo de su localización. El peritoneo parietal recubre la superficie interna de la pared abdominal y su vascularización procede de ramas arteriales de la propia pared. El peritoneo visceral cubre algunos órganos abdominales y su vascularización deriva de ramas arteriales de origen mesentérico, celíaco y pélvico. El drenaje venoso del parietal va hacia venas sistémicas que se dirigen hacia la vena cava, mientras que el del visceral drena a la vena porta [25].

Ambos tienen una estructura histológica consistente en 3 capas: mesotelio, lámina basal y estroma submesotelial. Cabe decir que en la literatura no existe un consenso claro sobre la definición histológica del peritoneo dado que en muchas ocasiones se define como una única capa de células mesoteliales [26]. Considerando la definición de tres capas, la más interna estaría formada por una monocapa de células mesoteliales rodeadas por una extensa red de vasos linfáticos (también llamados estomas). Estas células contienen cuerpos lamelares que excretan lípidos y

surfactante, y además realizan funciones inmunomoduladoras. El mesotelio presenta también un glicocálix compuesto de proteoglicanos y glucosaminoglicanos (GAG). Su función es establecer una barrera para evitar el paso de líquidos -en condiciones normales debería ser semipermeable- y regula la respuesta inflamatoria, favorece la reparación tisular y facilita el transporte de factores de crecimiento [27]. La lámina basal es la capa intermedia que hace de soporte de las células mesoteliales. Consiste en una matriz extracelular compuesta de colágeno tipo IV y laminina. Tanto mesotelio como lámina basal están sustentados por una última capa: el estroma submesotelial. Éste se compone de colágeno tipo I, elastina, fibronectina, proteoglicanos, GAG, miofibroblastos, adipocitos y vasos linfáticos y sanguíneos.

Por lo tanto, el peritoneo es una tricapa celular que actúa como barrera y es a la vez un órgano complejo que responde a cambios patofisiológicos regulando respuestas inflamatorias e inmunológicas, promueve la formación y degradación de fibrina, y facilita el transporte de factores de crecimiento [28].

4. Estado de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción vesical

La gran mayoría de estudios se basan en las propiedades del material *in vitro*, la capacidad para alojar cultivos celulares y los resultados de su implantación en modelos animales. A menudo se comparan los materiales entre ellos y en muy pocas ocasiones existe un grupo control que utilice tejido intestinal [29]. Actualmente se podría decir que la ingeniería tisular vesical clínica es anecdótica. Partiendo de los experimentos en modelo animal, si hubiera que elegir con la evidencia existente una técnica para realizar una ampliación vesical (plantear la sustitución es más complejo), probablemente habría que escoger una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirle *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas (o bien añadir células madre), cubriendo el

injerto con epiplon en el momento de la cirugía. Esta elección se ha de tomar con cautela dado que es difícil la extrapolación de resultados ya que existe una gran variabilidad entre los experimentos realizados en cuanto a animales, tiempo de seguimiento, tipos de biomaterial, tipos de cultivo celular, pruebas funcionales, etc. En muchas ocasiones los estudios no son comparables entre ellos pese a ser con el mismo biomaterial. También es importante recalcar que en general los modelos experimentales planteados suelen ser complejos dado que requieren de procedimientos de laboratorio difíciles de trasladar a la práctica clínica habitual. Además requieren de una minuciosa planificación previa por lo que su uso no puede ser decidido de forma intraoperatoria, por ejemplo si se constatará durante una cirugía que el intestino no pudiera utilizarse.

En la literatura médica hay publicados 18 estudios clínicos (169 pacientes en total) que realizan reconstrucciones vesicales utilizando biomateriales. El primero fue en el año 1957 cuando Bohne et al. utilizaron moldes plásticos para ampliar la vejiga a 7 pacientes a los que se les había realizado una cistectomía parcial; éstos estaban afectados de cistitis intersticial, neoplasia vesical o tuberculosis [6]. El tejido que se formó fue mayoritariamente fibrótico. Experimentos similares con moldes plásticos se llevaron a cabo entre 1958 y 1964, con resultados muy parecidos [30–32]. En 1963, Tsuji et al. utilizaron vejigas de perro conservadas en formaldehído que servían como soporte estructural temporal (se retiraban a las 3 semanas) para facilitar el crecimiento sobre éstas de la nueva pared vesical [33]. Reportaron que las vejigas creadas fueron de baja capacidad en casi todos los casos. Posteriormente se publicaron ensayos con esponjas gelatinosas con Nobecutan[®] (que actuaba de sellante) con resultados muy variables en cuanto a retracción y funcionalidad [34]. En la década de los 70 se publicaron varios estudios en los que se realizaban cistoplastias de ampliación utilizando dura madre [35–37]. En la mayoría de los casos no se describen signos de fibrosis o retracción de la nueva pared y solo en algunos estudios objetivaron la presencia de tejido muscular. Apenas reportan complicaciones postoperatorias, reabsorbiéndose la dura madre sobre la décima

semana. También durante la década de los 70 se publicaron algunos trabajos que utilizaban un material derivado del papel de arroz japonés (*Tetrapanax papyrifer*) al que aplicaron Nobecutan[®]. Este compuesto ejercía de molde y lo retiraban al mes por vía transuretral. Reportaron buenos resultados [38, 39], aunque de dudosa credibilidad. En 1988, Månsson et al. realizaron derivaciones urinarias heterotópicas (a modo de conducto ileal) con prótesis de Biocarbon[®] [40]. Este material estaba compuesto en un 99.9% de carbono vítreo, el cual era impermeable, químicamente inerte y muy resistente a los ácidos. Reportaron malos resultados: infecciones, fistulas urinarias y estenosis ureterales. En 2006, Atala et al. publicaron en *Lancet* el primer estudio en el cual se adhería al material experimental un cultivo celular de células uroteliales y de músculo liso autógenas [41]. Se realizó a 7 pacientes pediátricos afectados de vejiga neurógena. La nueva pared vesical se creó *in vitro* con colágeno o bien con un compuesto de colágeno y ácido poliglicólico (PGA); a estos materiales se les añadieron células uroteliales y de músculo liso autógenas. Solo se evidenciaron ampliaciones vesicales realmente funcionales en 2 pacientes (ambos con el compuesto de colágeno y PGA). En 2012, Caione et al. realizaron ampliaciones vesicales con submucosa de intestino delgado (SIS) a 5 pacientes pediátricos con extrofia vesical previamente reparada que presentaban vejigas retráctiles de baja capacidad [42]. La nueva pared acabó presentando una histología parecida a la normal pero no reportaron unos beneficios clínicos funcionales significativos dado que el aumento de capacidad y *compliance* vesical fue menor al esperado. En 2015, Bivalacqua et al. hicieron público el inicio de un ensayo clínico en humanos que consistía en realizar una derivación urinaria heterotópica artificial (a modo de conducto ileal) en pacientes sometidos a cistectomía radical [43]. Ésta se componía de una matriz biodegradable de PGA con células de músculo liso autógenas que se obtenían del propio tejido graso subcutáneo del paciente. Los primeros resultados publicados, a los 10 meses del implante, reportan presencia de urotelio, células musculares lisas desorganizadas, estroma fibrovascular y fibras nerviosas.

5. Motivación

Riñón, hígado, pulmón, corazón, páncreas, hueso, córnea, incluso intestino o pene son órganos sólidos trasplantables. La vejiga no forma parte de este grupo a pesar de ser una víscera de fácil acceso anatómico y con una alta prevalencia de sustitución total o parcial, sobre todo por enfermedad neoplásica. Finalizando la Facultad de Medicina me preguntaba por qué no era posible su trasplante, ya sea total o parcial, y por qué en la práctica clínica se utiliza el tejido intestinal como único sustituto vesical. Las causas -sin entrar en aspectos relacionados con la inmunosupresión- pueden estar relacionadas con la complejidad intrínseca del propio órgano: tiene múltiples y complejas conexiones vasculares, está en contacto con la orina, es un órgano hueco, tiene triple conexión urinaria y presenta una compleja inervación, la cual es imprescindible para su correcta funcionalidad. Probablemente las razones por las que tampoco se pueda regenerar sean muy similares pero a diferencia de la sustitución o trasplante sí que hay estudios clínicos de regeneración vesical en humanos, si bien éstos son escasos, complejos, con pocos pacientes y con resultados globales discutibles.

La motivación para poder diseñar un estudio en modelo animal que fuera interesante, no repitiera innecesariamente experimentos ya realizados, aportara algún aspecto novedoso y pudiese adaptarse a los recursos disponibles, fue preciso realizar una revisión de la literatura sobre el estado actual de la reconstrucción vesical con biomateriales. Ésta fue la finalidad del primer artículo (**Artículo de revisión**), el cual pretende describir y clasificar los diferentes materiales y por otro lado hacer una búsqueda sobre los estudios realizados en humanos hasta el día de hoy. Una vez hecha esta primera aproximación, nuestra razón para utilizar injertos de peritoneo parietal fue la falta de experiencia de éstos como sustituto vesical, la facilidad de la técnica quirúrgica y su reproducibilidad. Por otro lado, la razón para seleccionar una matriz de colágeno y elastina fue la disponibilidad de este biomaterial en nuestro centro (en la unidad de quemados) y los resultados de algunos estudios experimentales publicados con este material, reportando buenos resultados en

términos de biodegradabilidad, respuesta inmunológica, fácil procesamiento y presencia de signos de regeneración. A partir de estas premisas se diseñó el estudio experimental (**Artículo original**).

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Estado actual de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción vesical en humanos.

Gasanz C, Raventós C, Morote J. *Actas Urológicas Españolas*. 2017.

Resumen

Contexto y objetivo: La reconstrucción vesical es el procedimiento para sustituir o ampliar la vejiga, siendo el intestino el tejido utilizado en la práctica clínica habitual. Las complicaciones de su uso van desde las propias de una resección intestinal hasta las resultantes del contacto continuo de la orina con un tejido no preparado para ello. En este artículo se describen y clasifican los diferentes biomateriales y cultivos celulares utilizados en la ingeniería tisular vesical y se revisan los estudios realizados en humanos.

Adquisición de la evidencia: Se ha realizado una revisión de la literatura publicada en la base Pubmed entre 1950 y 2017, siguiendo los principios de la declaración PRISMA.

Síntesis de la evidencia: Se han realizado múltiples estudios *in vitro* y en modelo animal, pero solo se han realizado 18 experimentos en humanos, con un total de 169 pacientes. Las pruebas actuales indican que utilizar una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirle *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas, o bien células madre, sería la aproximación más realista para realizar una reconstrucción vesical experimental.

Conclusiones: La sustitución o ampliación vesical sin utilizar intestino continúa siendo hoy un reto, a pesar del progreso en la fabricación de biomateriales y del desarrollo de la terapia celular. Para plantear una traslación clínica efectiva será necesario en el futuro realizar estudios bien diseñados, con mayor número de pacientes y tiempo de seguimiento, además de estandarizar las pruebas funcionales de control.



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Estado actual de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción vesical en humanos

C. Gasanz*, C. Raventós y J. Morote

Servicio de Urología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 8 de noviembre de 2017; aceptado el 10 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Reconstrucción vesical experimental;
Biomaterial vesical;
Ingeniería vesical;
Vejiga artificial;
Derivación urinaria artificial

Resumen

Contexto y objetivo: La reconstrucción vesical es el procedimiento para sustituir o ampliar la vejiga, siendo el intestino el tejido utilizado en la práctica clínica habitual. Las complicaciones de su uso van desde las propias de una resección intestinal hasta las resultantes del contacto continuo de la orina con un tejido no preparado para ello. En este artículo se describen y clasifican los diferentes biomateriales y cultivos celulares utilizados en la ingeniería tisular vesical y se revisan los estudios realizados en humanos.

Adquisición de la evidencia: Se ha realizado una revisión de la literatura publicada en la base Pubmed entre 1950 y 2017, siguiendo los principios de la declaración PRISMA.

Síntesis de la evidencia: Se han realizado múltiples estudios *in vitro* y en modelo animal, pero solo se han realizado 18 experimentos en humanos, con un total de 169 pacientes. Las pruebas actuales indican que utilizar una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirle *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas, o bien células madre, sería la aproximación más realista para realizar una reconstrucción vesical experimental.

Conclusiones: La sustitución o ampliación vesical sin utilizar intestino continúa siendo hoy un reto, a pesar del progreso en la fabricación de biomateriales y del desarrollo de la terapia celular. Para plantear una traslación clínica efectiva será necesario en el futuro realizar estudios bien diseñados, con mayor número de pacientes y tiempo de seguimiento, además de estandarizar las pruebas funcionales de control.

© 2017 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carlosgasa@gmail.com (C. Gasanz).

<https://doi.org/10.1016/j.acuro.2017.11.005>

0210-4806/© 2017 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Gasanz C, et al. Estado actual de la ingeniería tisular aplicada a la reconstrucción vesical en humanos. Actas Urol Esp. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2017.11.005>

KEYWORDS

Experimental bladder reconstruction;
Bladder biomaterial;
Bladder engineering;
Artificial bladder;
Artificial urinary diversion

Current status of tissue engineering applied to bladder reconstruction in humans

Abstract

Context and objective: Bladder reconstruction is performed to replace or expand the bladder. The intestine is used in standard clinical practice for tissue in this procedure. The complications of bladder reconstruction range from those of intestinal resection to those resulting from the continuous contact of urine with tissue not prepared for this contact. In this article, we describe and classify the various biomaterials and cell cultures used in bladder tissue engineering and reviews the studies performed with humans.

Acquisition of evidence: We conducted a review of literature published in the PubMed database between 1950 and 2017, following the principles of the PRISM declaration.

Synthesis of the evidence: Numerous *in vitro* and animal model studies have been conducted, but only 18 experiments have been performed with humans, with a total of 169 patients. The current evidence suggests that an acellular matrix, a synthetic polymer with urothelial and autologous smooth muscle cells attached *in vitro* or stem cells would be the most practical approach for experimental bladder reconstruction.

Conclusions: Bladder replacement or expansion without using intestinal tissue is still a challenge, despite progress in the manufacture of biomaterials and the development of cell therapy. Well-designed studies with large numbers of patients and long follow-up times are needed to establish an effective clinical translation and standardisation of the check-up functional tests.

© 2017 AEU. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La reconstrucción vesical es el procedimiento realizado para sustituir o ampliar la vejiga. La ingeniería tisular constituye un conjunto de técnicas y conocimientos capaces de diseñar y crear un nuevo tejido. Aplicando esta a la reconstrucción vesical, el tejido generado debe ofrecer una buena función estructural y adaptarse para preservar el tracto urinario superior, mantener la continencia urinaria y promover un vaciado urinario adecuado. La derivación urinaria tras la cistoprostatectomía radical por neoplasia vesical es la indicación más frecuente de reconstrucción¹. Las causas más habituales que requieren ampliaciones vesicales son la tuberculosis, la cistopatía rádica, la cistitis intersticial y algunos tipos de vejigas neurogénicas.

El intestino es el tejido utilizado en la práctica clínica, dado que no hay otro material autógeno o heterógeno, natural o artificial, que haya demostrado mejores resultados. Las complicaciones del uso del intestino van desde las propias de una resección intestinal convencional (íleo paralítico, fallo de sutura, déficit nutricional, diarrea, esteatorrea) hasta las resultantes del contacto continuo de la orina con un tejido no preparado para ello. Estas últimas pueden producir desbalances electrolíticos (acidosis metabólicas hiperclorémicas), aparición de neoplasias (especialmente en las zonas de anastomosis), reabsorción por vía portal de algunos fármacos eliminados por la orina, lo que cambia la toxicidad de estos (destaca el metotrexato, la fenitoína y el litio) y la formación de litiasis. Mención aparte merecen las complicaciones mecánicas propias del reservorio: complicaciones estomacales, estenosis de la anastomosis ureteroentérica o uretroentérica, aumento no deseado del volumen máximo, residuo posmiccional elevado, incontinencia nocturna (estas 3 últimas en referencia a las neovejigas ortotópicas)^{2,3}. Estas complicaciones comportan un incremento de la morbilidad⁴.

Para prevenir los efectos negativos del uso de tejido intestinal como sustituto del urinario y considerando que en algunas reconstrucciones no es posible el uso de intestino (en pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, síndrome de intestino corto, irradiación abdominopélvica, etc.), en los años 50 se inició la experimentación con materiales no intestinales⁵. Desde entonces, el interés por encontrar un material distinto al intestino ha ido creciendo, y se han realizado múltiples estudios *in vitro* y en modelo animal (perro, conejo, rata y cerdo), pero hay escasos estudios en humanos. Esta revisión pretende describir y clasificar los diferentes materiales y revisar los estudios clínicos realizados en humanos hasta el día de hoy. Con este conocimiento previo, el objetivo es diseñar nuevos y mejores estudios y no repetir innecesariamente experimentos ya realizados.

Adquisición de la evidencia

Se ha realizado una revisión de la literatura publicada en PubMed desde 1950 hasta 2017, siguiendo los principios de la declaración PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*). Los términos utilizados en la búsqueda han sido *bladder biomaterials*, *bladder engineering*, *artificial bladder*, *artificial urinary conduit*, con los que resultaron 344 artículos. De estos, 94 realizaban experimentos que consistían en reconstruir la vejiga (tanto sustituciones como ampliaciones); se descartaron así los que incluían más órganos, los que eran estudios exclusivamente *in vitro* o bien los que eran artículos de revisión. Cabe resaltar que la mayoría de los estudios, tanto en animales como en humanos, son pequeñas series de casos —prospectivos— y con seguimientos cortos. Las pruebas de imagen o funcionales de control no están estandarizadas y, en ocasiones, están ausentes. Finalmente, se seleccionaron los estudios

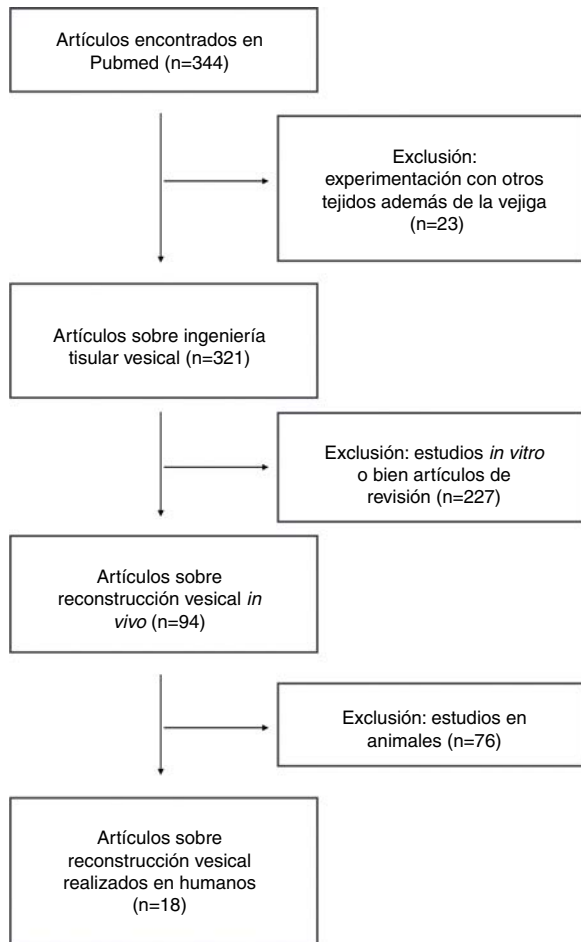


Figura 1 Diagrama de flujo de la bibliografía revisada.

in vivo realizados en humanos, que fueron 18 (169 pacientes en total). Los descartados corresponden a estudios *in vitro* o en modelo animal (rata, cerdo, conejo y perro), tal y como se muestra en el diagrama de flujo (fig. 1).

Síntesis de la evidencia

Qué saber sobre los materiales experimentales

La ingeniería tisular es un campo multidisciplinar que trata de crear sustitutos que restauren la función de un órgano o tejido. Al material empleado a menudo se le denomina genéricamente biomaterial o *scaffold* (andamio). El objetivo es utilizar un compuesto biodegradable, biocompatible y que pueda funcionar como *scaffold* desde el punto de vista estructural y celular y que permita el crecimiento de nuevo tejido sobre él⁶. Por lo tanto, la selección del material apropiado es fundamental. La gran mayoría de los estudios se basan en las propiedades del material *in vitro*, la capacidad para alojar cultivos celulares y en los resultados de su implantación en modelos animales. A menudo se comparan los materiales entre ellos y en muy pocas ocasiones existe un grupo control que utilice tejido intestinal⁷. Además, sobre los modelos animales se ha constatado que cada uno puede tener una respuesta diferente para un mismo

Tabla 1 Tipos de derivados naturales más utilizados

Basados en proteínas	Colágeno, elastina, laminina, fibronectina
Basados en hidratos de carbono	Alginato, ácido hialurónico, agarosa, quitosano

material, por lo que la extrapolación de los resultados es difícil.

Existen 2 tipos de abordaje cuando se utilizan estos materiales, que pueden clasificarse como abordaje simple o compuesto. El simple se refiere a que el material se implanta directamente, sin adherir cultivos celulares. El compuesto hace referencia a que, previamente a la implantación, se realizan cultivos celulares y se adhieren *in vitro* al material.

Los materiales que se emplean se pueden clasificar en 2 grandes grupos: biológicos y sintéticos. Los biológicos son derivados de compuestos naturales. Muestran buena biodegradabilidad y buena biocompatibilidad. En muchos casos presentan persistencia de factores de crecimiento tras el proceso de producción, aunque no siempre estos tienen capacidad regenerativa. La vascularización del material es más difícil cuanto mayor sea la superficie para injertar, lo que resulta en algunos casos en la necrosis del tejido. En general, no presentan buenas propiedades mecánicas³. Se subdividen en 2 tipos: derivados naturales y matrices acelulares. Los derivados naturales destacan por su escasa respuesta inmune y por ser fácilmente manipulables, con diferentes tipos según su origen (tabla 1). Por otro lado, las matrices acelulares constituyen el material más utilizado del grupo de los biológicos. Para su producción es necesaria una decelularización del tejido, que deja así una plataforma natural para el nuevo desarrollo tisular. Habitualmente son de origen porcino⁷, aunque también se realizan a partir de otros animales. Pese a que su composición es parecida entre especies, existen diferencias, sobre todo, en cuanto al tipo y a la distribución de las fibras de colágeno y elastina. Los tipos de matrices acelulares más utilizados se exponen en la tabla 2. Se ha de tener en cuenta que hay factores intrínsecos que determinan el comportamiento de la matriz, como son la estructura «arquitectónica» de esta, su porosidad y las técnicas de decelularización, esterilización y almacenaje empleadas^{8,9}. En una revisión publicada sobre matrices acelulares se afirma que hay una tendencia a la regeneración parcial o total del urotelio —es mucho más difícil la regeneración de la pared muscular—, hecho que compromete el correcto funcionamiento vesical¹⁰. La propia matriz puede tener factores de crecimiento endógenos que han resistido el proceso de decelularización. Existen algunos estudios que han incorporado factores de crecimiento exógenos que,

Tabla 2 Tipos de matrices acelulares más utilizadas

Submucosa vesical (<i>BAM: bladder acellular matrix</i>)
Submucosa de intestino delgado (<i>SIS: small intestinal submucosa</i>)
Dermis
Vesícula biliar
Membrana amniótica

Tabla 3 Tipos de polímeros sintéticos más utilizados

Ácido poliglicólico (PGA)
Ácido poliláctico (PLA)
Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)
Policaprolactona (PLC)
Ácido policaprolactona-co-láctico (PCL-PLA)
Urea-uretano policarbonato (PCUU)

según sus autores, tienen mejores resultados en cuanto a repoblación celular y neovascularización que las que no lo tienen. El implante de dichos factores es debatible, puesto que no se puede asegurar su distribución uniforme y, por otro lado, no se conoce la concentración adecuada de estos (dosis altas podrían afectar el proceso de cicatrización). Esto ha ocasionado que los factores de crecimiento exógenos se utilicen poco y que se potenciara más la línea de investigación con terapia celular^{11,12}.

Los materiales sintéticos son «no naturales» o «artificiales». Se puede interferir completamente en el proceso de fabricación y modificar así las propiedades de este. Pueden producirse tamaños grandes, que preservan una correcta estructura y fuerza tensil, y es posible modificar la degradabilidad del producto³. Presentan menor reconocimiento biológico por parte del huésped, con menos reacción inmunológica. Al no presentar actividad biológica, precisan en muchos casos de la siembra de cultivos celulares para favorecer el proceso regenerativo tras la implantación. Se subdividen en polímeros sintéticos y derivados de la seda. Los polímeros sintéticos son los más utilizados y los que tienen más posibilidades de procesamiento, incluso se realizan mediante impresoras 3D. Los más utilizados se exponen en la [tabla 3](#). Los derivados de la seda son producidos *in vitro* a partir de gusanos de seda *Bombyx mori*. Compuestos de 2 proteínas: sericina y fibroína. Desde un punto de vista mecánico, presentan buen soporte estructural, buena elasticidad y facilidad para el procesado¹³. Se reportaron casos de hipersensibilidad relacionados con la sericina, lo que obligó a la retirada de esta proteína durante la fabricación⁷.

Por tanto, el objetivo final de la ingeniería tisular vesical es identificar un material (asociando o no un cultivo celular) que sea capaz de reproducir *in vivo* los componentes de la pared vesical y, además, soportar agresiones que puedan proceder del propio huésped. El material ideal debería ser biocompatible, biodegradable y carente de reacción inmunológica. Además, debería tener unas propiedades mecánicas adecuadas (elasticidad, tensión de rotura) y mantener las propiedades biológicas que le permitieran funcionar correctamente como barrera urinaria.

Cultivos celulares sobre materiales experimentales

Células autógenas

Un material al que se adhieran células uroteliales y musculares lisas autógenas (células del propio individuo cultivadas *in vitro*) debería ser *a priori* la mejor opción para promover la regeneración vesical. No presentan riesgo de respuesta inmunológica. Existen varios supuestos que limitan su uso. Por ejemplo, hay indicaciones de sustituciones o ampliaciones

por razones oncológicas y, por lo tanto, el uso de células autógenas urinarias podría tener riesgo de recurrencia de la neoplasia. La mayoría de las indicaciones no oncológicas actuales son de origen neurológico. Hay cierta controversia al respecto: se cree que las células constituyentes de estas vejigas neurógenas son de por sí patológicas puesto que en estudios *in vitro* han mostrado menos contractilidad, menos capacidad de proliferación y de diferenciación. Aun así, en estudios *in vivo* han mostrado un comportamiento similar al de las células no patológicas¹⁴.

Células madre

Hay autores que las consideran «necesarias» para conseguir una regeneración exitosa del tracto urinario¹⁵. Son células no hematopoyéticas, multipotenciales y con capacidad de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* en diferentes líneas celulares. Además, tienen un efecto paracrino, hecho que mejora la regeneración tisular y la angiogénesis¹⁶. Las células madre adultas no presentarían los problemas éticos de las células madre embrionarias: no presentan riesgo de rechazo inmunológico y sí presentan riesgo de transformación neoplásica (aunque menos que las de origen embrionario), por lo que se ha de tener en cuenta el contexto clínico en el que se utilizan¹⁷. La identificación de la mejor población de células madre para su uso en tejidos urológicos aún está por determinar. En el tracto urinario se ha experimentado con células madre de tipo mesenquimal (*MSC: mesenchymal stromal cells*), adiposo (*ASC: adipose stem cells*), de folículo piloso (*HFSC: hair follicle stem cells*) y derivadas de la membrana amniótica¹⁸. Dado que no son células autógenas vesicales, pueden tener más predisposición a ser alteradas por la toxicidad de la orina. De todas ellas, las MSC parecen ser las más prometedoras. Han sido las más utilizadas hasta ahora, hay protocolos bien establecidos de aislamiento y crecimiento *in vitro*, son seguras en cuanto a ausencia de transformación maligna y se pueden diferenciar en múltiples líneas celulares (por ejemplo, en células musculares lisas y nerviosas presentes en el tracto urinario)¹⁵.

Cabe mencionar otra variante de las células madre, las llamadas «células madre inducidas» (*human cell reprogramming*). Gracias a las técnicas de transcripción genética, se reprograman células maduras en células madre. En el campo urológico se han llegado a crear células madre inducidas de 2 tipos: prostáticas y uroteliales. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse posteriormente a células maduras (próstata, vejiga, uréter)¹⁹.

Experiencia clínica

En el año 1957, Bohne et al. utilizaron moldes plásticos para ampliar la vejiga a 7 pacientes a los que se les había realizado una cistectomía parcial, afectos de cistitis intersticial, neoplasia vesical y tuberculosis. El molde plástico se retiró tras varias semanas y pretendía servir de andamio para que sobre él se creara una nueva pared. Los resultados no fueron exitosos: 3 muertos durante el postoperatorio y en el resto se asociaron complicaciones como reflujo vesicoureteral, ureterohidronefrosis e infecciones urinarias. El tejido formado era básicamente fibrótico⁵. Experimentos similares con moldes plásticos se llevaron a cabo entre 1958 (un paciente) y 1964 (28 pacientes), con resultados muy parecidos²⁰⁻²².

En 1963, Tsuji et al. realizaron reconstrucciones vesicales tras cistectomía parcial o total a 4 pacientes afectados de neoplasia utilizando vejigas de perro conservadas en formaldehído. Dichas vejigas servían como soporte estructural temporal (se retiraban a las 3 semanas) para facilitar el crecimiento sobre ellas de la nueva pared vesical. Reportaron que las vejigas creadas fueron de baja capacidad en casi todos los casos²³. En 1967 se realizó un experimento con esponjas gelatinosas en 10 pacientes, con resultados similares a los de los estudios anteriores²⁴. Otro estudio realizado 3 años más tarde con 5 pacientes añadió Nobecutan® a la esponja gelatinosa²⁵. El Nobecutan® es un compuesto formado por un acetato de etilo y una resina acrílica que actúa como sellante. Además, contiene disulfuro de tetrametilouramio, que actúa como bactericida. En este estudio con la esponja gelatinosa y Nobecutan® se obtuvieron mejores resultados: en 4 de los 5 pacientes se reportó una ampliación vesical con ausencia de complicaciones, incluso con la formación de urotelio y de músculo en la nueva pared.

En 1975, Kelami et al. realizaron cistoplastias de ampliación a 34 pacientes (6 microvejigas, 28 neoplasias vesicales) utilizando duramadre²⁶. Se lograron ampliaciones vesicales funcionales en casi todos los pacientes, aunque con múltiples complicaciones como recurrencia de la neoplasia y episodios de fuga urinaria y peritonitis. No hubo signos de fibrosis ni retracción a las 28 semanas de seguimiento, aunque no se objetivó tejido muscular en la nueva pared. En 1979, Günther et al. realizaron ampliaciones vesicales con duramadre a 9 pacientes, en los que destacó la formación de litiasis y retracción²⁷. En 1989, Kakimoto et al. publicaron una serie de 10 pacientes con cistoplastias realizadas con duramadre, con resultados clínicos satisfactorios²⁸. Reportaron epitelización de la dura a las 8 semanas. En 1990, Romero Pérez et al. publicaron su serie de 15 pacientes, con 5 años de seguimiento, sin reportar complicaciones relevantes²⁹. En 1995, Arian et al. realizaron un experimento similar con 10 pacientes, con resultados parecidos a los anteriores³⁰. En este grupo sí se observó tejido muscular desorganizado además de urotelio, con reportes de resultados satisfactorios a los 3 meses en 7 de los 10 pacientes. Apenas tuvieron complicaciones postoperatorias, con reabsorción de la duramadre sobre la décima semana.

En 1977 y 1978 se publicaron 2 estudios con 13 y 4 pacientes, respectivamente, los cuales tenían vejigas retráctiles por tuberculosis y cistitis intersticial^{31,32}. A estos se les realizó una ampliación vesical utilizando un material derivado del papel de arroz japonés (*Tetrapanax papyrifer*) al que aplicaron Nobecutan®. Este compuesto ejercía de molde y lo retiraban al mes por vía transuretral. El resultado mostró un tejido de granulación que cubría completamente el material implantado. Combinando ambos estudios, se obtuvieron resultados «excelentes» en 14 pacientes y negativos en 3 a 1-2 años de seguimiento. Es difícil creer en la veracidad de los resultados, puesto que informan que se multiplica por 10 la capacidad vesical poscirugía y, además, con escaso residuo posmiccional.

En 1988, Månsson et al. realizaron a 6 pacientes una derivación urinaria heterotópica (a modo de conducto ileal) con una prótesis de Biocarbon®. Este material está compuesto en un 99,9% de carbono vítreo, el cual es impermeable, químicamente inerte y muy resistente a los ácidos. Los resultados

no fueron buenos: se reportaron infecciones, fístulas urinarias y estenosis ureterales, con necesidad del explante de la derivación en casi todos los casos³³.

En 2006, Atala et al. publicaron el primer estudio en el cual se adhería al material experimental un cultivo celular³⁴. Se utilizó en 7 pacientes pediátricos afectados de vejiga neurogénica. La nueva pared vesical se creó *in vitro* con colágeno o bien con un compuesto de colágeno y ácido poliglicólico (PGA); a estos materiales se les añadieron células uroteliales y de músculo liso autógenas. El seguimiento medio fue de 46 meses, con buenos resultados histológicos en todos los casos (se identificó urotelio y músculo liso en la nueva pared vesical). Aun así, solo se evidenció una ampliación vesical funcional en 2 de los pacientes (ambos con el compuesto de colágeno y PGA). Los otros 5 pacientes no tuvieron una buena *compliance* ni capacidad vesical y necesitaron cateterismos intermitentes. También observaron mejores resultados histológicos en aquellos pacientes que cubrieron el material con epiplón.

En 2011, Moon et al. utilizaron pericardio bovino en una ampliación vesical tras un cierre de fístula enterovesical³⁵. Describieron que, tras la resección del orificio fistuloso, el tamaño vesical era pequeño y precisaba una ampliación, pero no era posible utilizar intestino, dado su mal estado (era un paciente con antecedentes de radioterapia y varias laparotomías). Por ello, utilizaron pericardio bovino a modo de nueva pared vesical. La cirugía fue «reparativa», con un seguimiento de 3 años y sin complicaciones. En sus resultados no reportaron datos de capacidad vesical ni *compliance*.

En 2012, Caione et al. realizaron ampliaciones vesicales con submucosa de intestino delgado (SIS) a 5 pacientes pediátricos con extrofia vesical previamente reparada que presentaban vejigas retráctiles de baja capacidad³⁶. En los 5 pacientes se utilizó SIS sin cultivo celular asociado. A los 6 meses se había logrado incrementar ligeramente la capacidad y a los 18 meses esta permanecía estable. La nueva pared presentaba una histología parecida a la normal (urotelio, músculo liso, fibras nerviosas, neovasos, abundante colágeno-III y sin evidencia de SIS). Utilizaron un grupo control con pacientes sanos: destacaba que el ratio músculo/colágeno era menor en los operados que en el control. No se evidenciaron complicaciones a 3 años de seguimiento. A pesar de ello, no reportaron unos beneficios clínicos funcionales significativos, dado que el aumento de capacidad y *compliance* vesical fue menor del esperado, quizás por esta relación músculo/colágeno inferior a la normal.

En 2015, Bivalacqua et al. hicieron público el inicio de un ensayo clínico de fase 1 en humanos que consistía en realizar una derivación urinaria heterotópica artificial (a modo de conducto ileal) a la que llamaron NUC (*neo-urinary conduit*) en 9 pacientes tratados mediante cistectomía radical³⁷. Este NUC estaba confeccionado *in vitro* y se componía de una matriz biodegradable de PGA con células de músculo liso autógenas. Estas células se obtenían del propio tejido graso subcutáneo del paciente, se cultivaban y luego se sembraban sobre el biomaterial. Durante el tiempo quirúrgico, el NUC era recubierto por epiplón del propio paciente con el objetivo de favorecer su vascularización. A las 7 semanas, las biopsias efectuadas en el NUC describían urotelio y células musculares lisas desorganizadas. Los últimos resultados

que reportaron fueron a los 10 meses del implante, en los que persistía la misma celularidad, pero más desarrollada y organizada, así como estroma fibrovascular y fibras nerviosas.

Discusión

La búsqueda de una técnica, material y grupo celular adecuados para realizar una ampliación o sustitución vesical funcional es difícil. No hay que tener solo en cuenta la competencia estructural del tejido o la respuesta biológica natural de este, sino que deben añadirse los efectos tóxicos de la orina.

Actualmente se podría decir que la ingeniería tisular vesical «clínica» es anecdótica. Partiendo de los experimentos en modelo animal, si hubiera que elegir con las pruebas existentes una técnica para realizar una ampliación (plantear la sustitución es más complejo), probablemente habría que escoger una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirles *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas (o añadir células madre), cubriendo el injerto con epiplón en el momento de la cirugía. El seguimiento debería ser a largo plazo, estricto, incluyendo pruebas de imagen, urodinámicas e, idealmente, biopsias de control.

En cuanto a la formación del nuevo tejido, cabe destacar que no solo es importante una regeneración del urotelio, sino también del músculo liso. La regeneración urotelial parece más sencilla y se ha logrado con muchas combinaciones, tanto de material aislado como combinado con cultivos celulares. Uno de los grandes problemas es que en muchas ocasiones la regeneración muscular es solo parcial, es estructuralmente desorganizada, no está bien integrada con el resto de la vejiga o bien carece de vascularización e inervación. En muchos estudios, tanto en animales como en humanos, dicha regeneración muscular es aberrante, insuficiente o directamente es un tejido fibroso retraído, lo que provoca que la vejiga no sea funcional. Es importante tener en cuenta que no es lo mismo realizar un reservorio artificial incontinente que uno continente, y que es fundamental en este último el papel del músculo liso para el correcto funcionamiento.

Conclusión

A pesar del desarrollo de la terapia celular y del progreso en la fabricación de biomateriales, la aplicación clínica real de estos en la reconstrucción vesical no es inminente y continúa siendo un reto a día de hoy. Es preciso realizar más estudios, aumentar el número de pacientes incluidos, el tiempo de seguimiento y estandarizar las pruebas funcionales de control. Solo así se podrá hallar un biomaterial —con o sin cultivo celular añadido— que desplace al tejido intestinal como *gold standard* de sustituto vesical.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

1. Pokrywczynska M, Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering - an analysis of 131 clinical cases. *Exp Biol Med*. 2014;239:264–71.
2. El-Taji OM, Khattak AQ, Hussain SA. Bladder reconstruction: The past, present and future. *Oncol Lett*. 2015;10:3–10.
3. Alberti C. Whyever bladder tissue engineering clinical applications still remain unusual even though many intriguing technological advances have been reached. *G Chir*. 2016;37:6–12.
4. Van der Aa F, Joniau S, van den Branden M, van Poppel H. Metabolic changes after urinary diversion. *Adv Urol*. 2011;2011:764325.
5. Bohne AW, Urwiller KL. Experience with urinary bladder regeneration. *J Urol*. 1957;77:725–32.
6. Atala A. Regenerative bladder augmentation using autologous tissue-when will we get there? *J Urol*. 2014;191:1204–5.
7. Lam van Ba O, Aharony S, Loutochin O, Corcos J. Bladder tissue engineering: A literature review. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;82:31–7.
8. Freytes DO, Stoner RM, Badylak SF. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;84:408–14.
9. Pokrywczynska M, Jundziłł A, Adamowicz J, Drewa T. Tissue engineering - experimental method of urinary bladder regeneration. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013;67:790–9.
10. Glybochko PV, Olefir YV, Alyaev YG, Zharikova TM. Tissue engineering of urinary bladder using acellular matrix. *Urologiia*. 2017;1:89–94.
11. Song L, Murphy SV, Yang B, Xu Y, Zhang Y, Atala A. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20:163–72.
12. Pokrywczynska M, Gubanska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: The state of the art and future directions. *Biomed Res Int*. 2015;2015:613439.
13. Tu DD, Chung YG, Gil ES, Seth A, Franck D, Cristofaro V, et al. Bladder tissue regeneration using acellular bi-layer silk scaffolds in a large animal model of augmentation cystoplasty. *Biomaterials*. 2013;34:8681–9.
14. Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull*. 2011;97:81–104.
15. Adamowicz J, Kowalczyk T, Drewa T. Tissue engineering of urinary bladder - current state of art and future perspectives. *Cent European J Urol*. 2013;66:202–6.
16. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Ortiz-Gonzalez XR, Du J. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41–9.
17. Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*. 2003;300:913–6.
18. Drewa T. Using hair-follicle stem cells for urinary bladder-wall regeneration. *Regen Med*. 2008;3:939–44.
19. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamana S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–72.
20. Tsulukidze AP, Murvanidze DD, Dvali RF, Ivashchenko GM. Formation of a reservoir for urine from plastmass after total cystectomy. *Urol Mosc*. 1961;26:46–51.
21. Tsulukidze AP, Murvanidze DD, Ivashchenko GM, Dvali RF. Further modifications in the formation of the «urinary bladder» around a temporary endo-prosthesis made of plastmass. *Urol Mosc*. 1961;26:28–9.
22. Tsulukidze AP, Murvanidze D, Dvali R, Ivashchenko G. Formation of a bladder by a plastic shell after total cystectomy. *Br J Urol*. 1964;36:102–5.

23. Tsuji I, Kuroda K, Fujieda J, Shiraishi Y, Kassai T, Shida H. A clinical and experimental study on cystoplasty not using the intestine. *J Urol.* 1963;89:214–25.
24. Tsuji I, Shiraishi Y, Kassai T, Kunishima K, Orikasa S, Abe N. Further experimental investigations on bladder reconstruction without using the intestine. *J Urol.* 1967;97:1021–8.
25. Orikasa S. Study on regeneration and reconstruction of the urinary tract. V. Experimental and clinical cystoplasty using alcohol treated gelatin sponge. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1967;58:449–64.
26. Kelâmi A. Duraplasty of the urinary bladder. Results after two to six years. *Eur Urol.* 1975;1:178–81.
27. Günther M, Pietruschka U, Siegel W, Erdmann T. Use of the dura in the surgical treatment of bladder cancer. *Z Urol Nephrol.* 1979;72:473–82.
28. Kakimoto S, Sakai H, Kubota S, Kondo A, Kishikawa M. Partial cystectomy for bladder carcinoma: Lyophilized human dura as a bladder wall substitute. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1989;80:22–7.
29. Romero Pérez P, Lobato Encinas J, Megía Carrigos J, Pelluch AA, Mira LA. Partial parietal cystectomy and cystoplasty using a lyophilized human dura mater patch as an alternative in palliative surgery for bladder cancer. *Arch Esp Urol.* 1990;43:867–75.
30. Arikani N, Ozdiler E, Yaman O, Gögüs O. Augmentation duracystoplasty in neurogenic bladder dysfunction. *Int J Urol.* 1995;2:172–5.
31. Taguchi H, Ishizuka E, Saito K. Cystoplasty by regeneration of the bladder. *J Urol.* 1977;118:752–6.
32. Fujita K. The use of resin-sprayed thin paper for urinary bladder regeneration. *Invest Urol.* 1978;15:355–7.
33. Månsson W, Harzmann R. Clinical experience with an alloplastic stoma prosthesis (Biocarbon) for urinary conduits and cutaneous ureterostomy. *Scand J Urol Nephrol.* 1988;22:223–6.
34. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006;367:1241–6.
35. Moon SJ, Kim DH, Jo JK, Chung JH, Lee JY, Park SY, et al. Bladder reconstruction using bovine pericardium in a case of enterovesical fistula. *Korean J Urol.* 2011;52:150–3.
36. Caione P, Boldrini R, Salerno A, Nappo SG. Bladder augmentation using acellular collagen biomatrix: A pilot experience in exstrophic patients. *Pediatr Surg Int.* 2012;28:421–8.
37. Kates M, Singh A, Matsui H, Smith ND, Schoenberg MP, Bivalacqua TJ. Tissue-engineered urinary conduits. *Curr Urol Rep.* 2015;16:8.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En un modelo experimental porcino, la utilización de una matriz de colágeno y elastina asociada a peritoneo parietal favorece la regeneración tisular en la reparación de un defecto vesical.

OBJETIVOS

1. Analizar **macroscópicamente** la nueva pared vesical a las 6 semanas de la intervención y comparar los resultados entre los grupos de animales sometidos a peritoneocistoplastia con y sin matriz de colágeno y elastina. Se comparará cualitativamente la presencia de seroma, signos de infección, áreas adelgazadas, defectos de continuidad y cualquier otro hallazgo macroscópico relevante. Además, se analizará cuantitativamente la retracción y se comparará entre ambos grupos.
2. Analizar **microscópicamente** la nueva pared vesical a las 6 semanas de la intervención y comparar los resultados entre los grupos de animales sometidos a peritoneocistoplastia con y sin matriz de colágeno y elastina. Se comparará cuantitativamente la presencia de fibrosis y de neoangiogénesis en ambos grupos. Además, se describirá cualitativamente la organización celular, la presencia de células transicionales, la existencia de restos de biomaterial, la presencia de fibras musculares y cualquier otro hallazgo anatomopatológico relevante.
3. Finalmente se analizará y comparará el resultado **funcional** vesical mediante un estudio de presión/volumen, que se realizará antes de la cirugía y a las 6 semanas de seguimiento.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio, participantes y consideraciones éticas

Se trata de un estudio experimental prospectivo y aleatorizado realizado en modelo porcino. Se llevó a cabo entre 2014 y 2017 en el Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Se asignó aleatoriamente a los animales en dos grupos: grupo 1 y grupo 2. A los sujetos del grupo 1 se les realizó una peritoneocistoplastia con biomaterial; a los del grupo 2 se les realizó una peritoneocistoplastia sin biomaterial. Se utilizaron 16 hembras porcinas (*Large White x Landrace*) de 3 meses de edad aproximadamente y pesos entre 23 y 44 kg. Se utilizaron hembras por la facilidad del sondaje uretral. El tiempo de supervivencia de los animales hasta la eutanasia fue de 6 semanas, que consideramos adecuado de acuerdo a estudios previos [49-51] y a las posibilidades de estabilización de nuestro centro. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (registro 20/13) del VHIR de acuerdo a las directivas de la Unión Europea (2010/63/EU). La justificación para utilizar el cerdo como modelo experimental fue su compatibilidad con las técnicas a realizar, su similitud anatómica con el ser humano y el fácil manejo quirúrgico de la vejiga. Dentro del marco de referencia IDEAL-Device (Idea, Development, Exploration, Assessment, Long term study) para el desarrollo de un nuevo producto médico, el estudio se clasifica en estadio 0 (preclínico) [44].

Preparación del injerto

El injerto de peritoneo parietal se obtuvo disecando un fragmento de 10 x 10 cm de la pared abdominal anterior; una vez disecado, este fragmento se doblaba por la mitad para mejorar su consistencia y se almacenaba en un contenedor con suero fisiológico a temperatura ambiente hasta que ser utilizado durante el transcurso de la cirugía. La matriz de colágeno y elastina (Matriderm[®], MedSkin Solution Dr. Suwelack AG) la aportó de forma gratuita la empresa *Bioser*, distribuidora en

España del biomaterial. La razón para utilizar este biomaterial fue la disponibilidad de éste en nuestro hospital (en la unidad de quemados). Consiste en una matriz acelular de 1 mm de grosor formada por colágeno y α -elastina, ambos de origen bovino [45]. En reconstrucciones cutáneas tras traumatismos y quemaduras ha demostrado promover la regeneración tisular facilitando la proliferación celular y la neoangiogénesis [46–48].

Procedimiento quirúrgico

La cirugía se realizaba bajo anestesia general. El primer paso era colocar una sonda vesical de 3 luces y realizar un estudio funcional de presión/volumen, como se explica más adelante. Posteriormente se realizaba una laparotomía media infraumbilical, se abría la cavidad peritoneal localizando la vejiga y se resecaba un fragmento de 5 x 5 cm de la cara anterior de ésta. Una vez comprobado que la sonda vesical estaba indemne, se sustituía la pared vesical resecada por el injerto de peritoneo parietal más el biomaterial (se adherían perfectamente por contacto sin necesidad de suturas o adhesivos) o bien se utilizaba el injerto de peritoneo parietal de forma aislada. Para realizar la cistoplastia se utilizaban dos suturas hemicontinuas de poliglecaprona 4-0 (Monocryl[®], Ethicon). El biomaterial siempre se colocaba en la cara interna vesical. Se realizaban puntos de referencia con polipropileno 2-0 (Prolene[®], Ethicon) en los bordes de la resección (en la serosa) para facilitar la localización de la zona de la cistoplastia a posteriori. Tras la cirugía los animales permanecían en el mismo estabulario hasta la eutanasia (a la sexta semana) controlando diariamente el peso e identificando las posibles complicaciones postoperatorias. La sonda vesical se retiraba al final de la segunda semana postoperatoria (entre el día 10 y el 14).

Estudio histológico

El análisis anatomopatológico se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron. Las piezas de cistectomía se analizaban de forma macroscópica estudiando cualitativamente la presencia de seroma y/o de exudado purulento (A: ausencia; B: presencia) y el perímetro de la cistoplastia (A: integración completa; B: áreas adelgazadas o defectos de continuidad). Asimismo se describía cualquier otro hallazgo macroscópico relevante. Por otro lado, se analizó cuantitativamente la superficie de la nueva pared calculando el porcentaje de retracción. Para el estudio microscópico se seleccionaron 6 zonas representativas: 2 muestras de la nueva pared, 2 muestras del área de transición y 2 muestras de la pared vesical normal. A los fragmentos se les realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (H&E), tricrómico de Gömöri y elástica de Van Gieson. Las muestras se describían cualitativamente en términos de morfología y organización celular, presencia de células transicionales y restos de biomaterial. Se estudió cuantitativamente la fibrosis de la nueva pared vesical con una magnificación 40x (4x objetivo y 10x ocular) utilizando un *histoscore* (H-score). El cálculo H-score se hacía evaluando el porcentaje de fibroblastos y su intensidad en la tinción de tricrómico de Gömöri (0: ausencia de tinción; 1+: débil; 2+: moderada; 3+: intensa). El resultado final (en rango 0-300) se realizaba: $[1x(\% \text{ células } 1+) + 2x(\% \text{ células } 2+) + 3x(\% \text{ células } 3+)]$. Por otro lado, se cuantificaba el número de vasos sanguíneos de la nueva pared vesical realizando un contaje manual; el valor de cada muestra se obtenía de realizar la media aritmética en 10 campos microscópicos (a 40x aumentos) del número de vasos contabilizados por campo.

Estudio funcional

Se realizaba al principio de cada una de las cirugías, es decir, antes de la cistoplastia inicial y antes de la eutanasia, a través de una sonda vesical de tres vías de 18 Ch conectada a un monitor de presión. Se procedía al llenado vesical con suero fisiológico a una velocidad aproximada de 25 mL por minuto. La presión y volumen máximo de la vejiga se fijaba en el momento que detectábamos la salida de líquido por la sonda. Cabe destacar que el estudio funcional pre-eutanasia se realizaba después de la laparotomía media, una vez la vejiga estaba expuesta; de esta manera se podían observar los posibles defectos de expansión de la nueva pared vesical o bien pérdidas de líquido por solución de continuidad.

Análisis estadístico

El número total de animales se calculó tras los resultados preliminares en relación a la retracción de la nueva pared vesical (asumimos una diferencia de un 60% entre grupo 1 y grupo 2). Con una potencia de 0.8 y un riesgo alfa de 0.05, necesitábamos 7 animales por grupo para hallar diferencias significativas. Una vez finalizó el experimento y organizada la base de datos, se realizó un análisis univariante para describir los cambios de peso de los animales, la retracción, los cambios de presión y volumen, el *histoscore* de fibrosis y el número de vasos formados en la nueva pared. Las comparaciones entre el grupo 1 y el 2 se analizaron con el test U Mann-Whitney mediante SPSS® (V24.0), definiendo estadísticamente significativo los valores de $p < 0.05$.

En el **Artículo original** se especifica con más detalle algunos aspectos relacionados con el material y métodos del estudio experimental.

RESULTADOS

ARTÍCULO ORIGINAL

Use of an acellular collagen–elastin matrix to support bladder regeneration in a porcine model of peritoneocystoplasty.

Gasanz C, Raventós C, Temprana J, Esteves M, Fonseca C, de Torres IM, Morote J. *Central European Journal of Urology*. 2018.

Abstract

Introduction: Bladder reconstruction without using the intestine remains a challenge to this day despite the development of new biomaterials and cell cultures. Human bladder engineering is merely anecdotic, and mostly in vitro and animal studies have been conducted.

Material and Methods: In our study using a porcine model, we performed a bladder augmentation using an autologous parietal peritoneum graft (peritoneocystoplasty) and determined whether the attachment (group 1) or not (group 2) of an acellular collagen–elastin matrix had better histologic and functional results. Thus far, peritoneocystoplasty has rarely been performed or combined with a biomaterial.

Results: After 6 weeks, we observed different degrees of retraction of the new bladder wall in both groups, although the retraction was lower and the histological analysis showed more signs of regeneration (neoangiogenesis and less fibrosis) in group 1 compared with group 2. No transitional cells were found in the new bladder wall in any of the groups, and no differences were observed in the functional test results.

Conclusions: Performing a peritoneocystoplasty is an easy and safe procedure. The data supports the benefit of an acellular collagen–elastin matrix to reinforce bladder regeneration. However, we observed too much retraction of the new wall and the histologic results were not good enough to consider it an appropriate cystoplasty technique.

Use of an acellular collagen-elastin matrix to support bladder regeneration in a porcine model of peritoneocystoplasty

Carlos Gasanz¹, Carles Raventós¹, Jordi Temprana-Salvador², Marielle Esteves³, Carla Fonseca³, Inés de Torres², Juan Morote¹

¹Department of Urology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Pathology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Citation: Gasanz C, Raventós C, Temprana-Salvador J. Use of an acellular collagen-elastin matrix to support bladder regeneration in a porcine model of peritoneocystoplasty. Cent European J Urol. 2018; 71:

Article history

Submitted: June 18, 2018

Accepted: Aug. 6, 2018

Published online: Aug. 13, 2018

Corresponding author

Carlos Gasanz

Hospital Vall d'Hebron

Department of Urology

Barcelona, Spain

..... Street, No.

phone:

.....

carlosgasa@gmail.com

Introduction Bladder reconstruction without using the intestine remains a challenge to this day despite the development of new biomaterials and cell cultures. Human bladder engineering is merely anecdotic, and mostly in vitro and animal studies have been conducted.

Materials and methods In our study using a porcine model, we performed a bladder augmentation using an autologous parietal peritoneum graft (peritoneocystoplasty) and determined whether the attachment of an acellular collagen-elastin matrix (Group 1) or lack of (Group 2) had better histologic and functional results. Thus far, peritoneocystoplasty has rarely been performed or combined with a biomaterial.

Results After 6 weeks, we observed different degrees of retraction of the new bladder wall in both groups, although the retraction was lower and the histological analysis showed more signs of regeneration (neo-angiogenesis and less fibrosis) in Group 1 than when compared with Group 2. No transitional cells were found in the new bladder wall in any of the groups, and no differences were observed in the functional test results.

Conclusions Performing a peritoneocystoplasty is a easy and safe procedure. The data supports the benefit of an acellular collagen-elastin matrix to reinforce bladder regeneration. However, in our study we observed too much retraction of the new wall and the histologic results were not acceptable to consider it an appropriate cystoplasty technique.

Key Words: acellular matrix ↔ bladder regeneration ↔ biomaterial ↔ peritoneocystoplasty
↔ tissue engineering

INTRODUCTION

Bladder reconstructive surgery encompasses surgical procedures involving the substitution or enlarging of the bladder. Radical cystoprostatectomy due to muscle-invasive bladder cancer is the most prevalent condition warranting the removal and substitution of the urinary bladder [1]. Augmentation cystoplasty is required in certain types of neurogenic bladder dysfunction, interstitial cystitis (painful bladder syndrome), and severe radiation-induced

or urogenital tuberculosis contracted bladder. Currently, the human intestine is used in daily clinical practice to substitute or enlarge the bladder. It has many drawbacks, not only due to bowel resection, but also to relevant complications related to the contact of the urine with a tissue not biologically prepared for this purpose, which involves an increase in morbidity rates [2, 3]. Bladder tissue engineering is dedicated to design and produce a material that can replace the bladder tissue instead of using the intestine. Mostly in vitro and animal studies have been

conducted with different types of biomaterials, cell cultures and growth factors [4]. However, the human bladder engineering is merely anecdotic and remains an enormous challenge to this day [5, 6, 7]. The ideal material should be readily biodegradable, biocompatible and useful as a scaffold, so that it could host tissue development [8, 9].

In our study using a porcine model, we made bladder augmentations using an autologous parietal peritoneum graft (peritoneocystoplasty) and determined whether the attachment or not of an acellular collagen–elastin matrix to this peritoneum graft had better histologic and functional results. Thus far, peritoneocystoplasty has rarely been performed or combined with a biomaterial.

MATERIAL AND METHODS

The animals were divided in two groups: Group 1 was peritoneocystoplasty plus biomaterial and Group 2 was peritoneocystoplasty without the biomaterial. The total survival time of the animals was six weeks.

Animals and ethics statement

Experiments were performed on 16 female hybrid pigs (Large White x Landrace) weighing 27–40 kg. All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (registration number: 20/13) of the Vall d'Hebron Research Institute and conducted in compliance with the Spanish legislation in accordance with the European Union directives (2010/63/EU). The experiment was categorized as a stage 0 (preclinical study) for the evaluation of a new medical product according to IDEAL-Device (Idea, Development, Evaluation, Assessment and Long-term) [10].

Graft preparation

The biomaterial consists of a 1 mm-thick structurally intact native collagen matrix coated with α -elastin hydrolysate of bovine origin (Matriderm[®], MedSkin Solution Dr. Suwelack AG, Germany). It is sterilized by gamma irradiation after freeze-drying and is stored at room temperature. It has been tested in clinical trials to treat full-thickness burns, trauma and reconstructive wounds. It has shown good results when applied simultaneously with split-thickness skin grafts in single-stage operative procedures. The material promotes cell migration and proliferation and encourages early neoangiogenesis [11, 12]. We also used a parietal peritoneum graft obtained through a midline down laparotomy. A 10×10 cm graft was completely dissected from the anterior abdominal

wall musculature. The graft was later taken folded in half, and then folded in half again. It was stored in a covered container with a 0.9% sterile saline solution at room temperature.

Anesthesia and surgical procedure

A urinary catheter was inserted before initiating the surgical procedure to perform the first functional test (as explained in the functional test section). A lower midline laparotomy incision was performed to access the peritoneal cavity. After a general inspection, we completely dissected the peritoneum graft from the anterior abdominal wall musculature and stored it. Afterwards, we located the bladder and performed a 5×5 cm exeresis of the anterior wall. Afterwards, we made simple interrupted stitches of polypropylene (Prolene[®], Ethicon) around the edges of the exeresis (in the serous membrane) as reference points. Six weeks later, these marks helped us to identify the surgical borders and measure macroscopically the eventual graft shrinkage. After performing these referral stitches, we randomly divided the pigs in two groups. In Group 1, we substituted the resected bladder wall with a 5×5 cm compound graft of peritoneum plus the biomaterial. Both were attached easily by contact in the operating theater without glue or stitches. The biomaterial was in the inner part of the bladder and the peritoneum was in the outer part. The graft was sutured to the bladder wall (all layers) with two running stitches of poliglecaprone 4-0 (Monocryl[®], Ethicon). In Group 2, we performed the same procedure, but only with the peritoneum graft without attaching the biomaterial. The final macroscopic results are shown in Figure 1. The animals kept the urinary catheter for 10 days. After six weeks, we repeated the functional test and performed the cystectomy and euthanasia. The animals were euthanized by receiving an anesthetic IV overdose of 2 g of tiobarbital (Tiopental[®], B. Braun Melsungen AG).

Specimen harvest and histological procedures

The gross examination analysis of the bladder, subsequent to euthanasia, involved four steps: identify the new bladder wall formed from the graft, study the seroma formation, local infection, and tissue integrity. In measuring the new bladder wall, the polypropylene stitches previously placed along the edges of the resected area were very useful. We obtained this measure in centimeters and calculated the eventual shrinkage rate of the new wall. We used qualitative scales to evaluate the rest of the parameters. First, the seroma in the new wall was classified into A (no alteration) or B (mild or massive seroma).

Second, we evaluated whether signs of infection were present and categorized the signs as either A (no alteration) or B (purulent exudate). Lastly, we carefully examined the perimeter of the graft to study the tissue integration with the normal bladder wall and classified it as either A (complete integration) or B (narrow areas at the edges or lack of integration). The histological analysis was performed by selecting six representative sections of the bladder (new wall, transition zones and normal wall). These tissue sections were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 4 μ m. These sections were stained using the hematoxylin and eosin (H&E), Gömöri trichrome and Elastica van Gieson. The slides were qualitatively assessed for cellular organization with regard to the vessel density, cellular infiltration, fibrosis, presence of urothelial cells and traces of the biomaterial. The quantification of fibrosis and vascular rate was counted on a light microscope at 40x magnification field (4x objective and 10x ocular). To quantify the fibrosis, we used an histoscore (H-score) that was calculated by assessing the percentage of fibrosis cells and the intensity of the Gömöri staining (graded as 0: non-staining; 1+: weak; 2+: moderate; 3+: strong). The final score was calculated [1x(% cells 1+) + 2x(% cells 2+) + 3x(% cells 3+)], and it ranged from 0 to 300. The blood vessels were quantified by averaging the total number in 10 different microscopic fields of the new bladder wall per animal.

Functional test

A volume/pressure test by filling the bladder to the leak point was performed just before the first surgery and before euthanasia. We used an 18 Ch double-lumen urinary catheter connected to a custom-designed software, and we filled the bladder with normal saline at 25 mL/min. We set the maximum bladder capacity when the pericatheter leak was detected. Note that the functional test before euthanasia was made after the laparotomy, so that we could observe how the bladder was expanding throughout the filling process, especially in the graft area.

Statistical analysis

Total number of animals was calculated after the preliminary results in relation to the retraction rate (we presumed a difference of 60% between Group 1 and 2). With a power (1- β -risk) of 0.8 and α -risk of 0.05, we needed 7 animals per group to find significant statistical differences. Univariate analysis was used to describe the animal weight, retraction, differences in maximum volume and pressure,

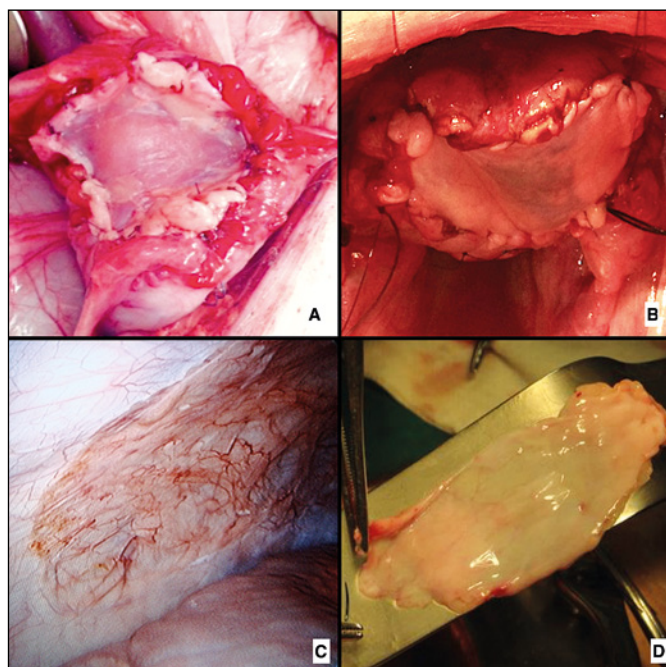


Figure 1. Representative macroscopic steps of the implantation procedure. **A.** Peritoneum + biomaterial cystoplasty. **B.** Peritoneum cystoplasty. **C.** Anterior abdominal wall after removing the peritoneum graft. **D.** Peritoneum graft.

H-score and number of vessels. In order to describe the variables we calculated the mean, median, variance and standard deviation. Comparisons between Group 1 and Group 2 were analyzed with the Mann-Whitney U test using SPSS® (V24.0). Statistically significant values were defined as $p < 0.05$.

RESULTS

General considerations and complications of the surgical procedure

The original idea of dividing the animals into two exact groups was not possible in three cases because of the fragility of the peritoneum graft. We could not perform adequate stitches because they provoked ruptures at the graft edges. In these three cases, we added the biomaterial to strengthen the peritoneum graft. Thus, we used 11 peritoneum plus biomaterial grafts (Group 1) and 5 peritoneum grafts (Group 2) in total. As a serious complication, one animal (Group 1) required further surgery because of an intraperitoneal urinary leakage caused by the partial rupture of the graft suture line, which was successfully repaired. We noticed the importance of cutting the tip of the urinary catheter (respecting the balloon) to prevent graft damage. All the animals were weighed twice: at the beginning and after six weeks. Results are shown in Table 1.

Macroscopic examination

We did not observe seroma, local infection, or lack of integration in any of the groups after six weeks. In two cases belonging to Group 1, a 1×1 cm stone attached to the new bladder wall was observed (Figure 2D). The mean retraction in Group 1 was 28.6% (10–80%) and that in Group 2 was 72% (60–80%), which was statistically significant ($p = 0.007$). Macroscopically, that difference was self-evident, as shown in Figure 2. In all cases we observed a correct wall thickness without narrow areas (Figure 3).

Histological analysis

In Group 1, the H&E stain examination (Figure 4) of the new-born bladder wall tissue at six weeks showed mucous ulceration, moderate fibrosis tissue, glandular cystic cystitis, poor neovascularization and hardly any bundle of disorganized smooth muscle tissue. No urothelial cells were observed in the new bladder wall, although we observed emerging signs of urothelial epithelization and chronic inflammatory eosinophilic response at the edges. Most of the new vessels were found to be subepithelial, and fibrosis was predominantly found in the deepest part of the tissue (Figure 5). In addition, traces of the monocryl stitches were found, but there were hardly any traces of the bio-material. In Group 2, the H&E stain showed mucous ulceration, massive fibrosis tissue and lack of urothelium and muscle tissue. Using the Gömöri trichrome stain, the mean H-score assessment of fibrosis was 40.9 (10–65) for Group 1 and 129 (50–220) for Group 2, and the difference was statistically significant ($p = 0.007$). To quantify the vessels of the new wall, we used the H&E and the Elastica van Gieson stain. The average number of blood vessels per field in Group 1 was 61.3 (12–103) and 33.8 (17–52) in Group 2, and the difference was also statistically significant ($p = 0.03$).

Functional results

The test was finally conducted on 9 animals (Group 1: 6, Group 2: 3) because placing the urinary catheter in the rest of the them was not possible because of urethral anatomical limitations. The mean pressure variation in Group 1 was 3.5 mmHg and that in Group 2 was -0.3 mmHg, which was not statistically significant ($p = 0.051$). Results are shown in Table 1.

DISCUSSION

Obtaining the best technique and material to perform an augmentation cystoplasty or a bladder substitution without using the intestine remains a chal-

Table 1. Results of the variables investigated and comparison between groups

Variable*	Group 1	Group 2	p-value
Weight increase, kg	5.9 ± 2.9	8.2 ± 3	0.18
Retraction rate, %	28.6 ± 19.5	72 ± 8.3	<0.05
Fibrosis H-score	40.9 ± 18.2	129 ± 64	<0.05
Vessels, **	61.3 ± 24.8	33.8 ± 13.6	<0.05
Volume variation, mL	30 ± 103.7	-46.6 ± 61.1	0.16
Pressure variation, mmHg	3.5 ± 2.3	-0.3 ± 2	0.051

* Values are reported as mean ± standard deviation

** Average number of blood vessels per field (40x magnification)

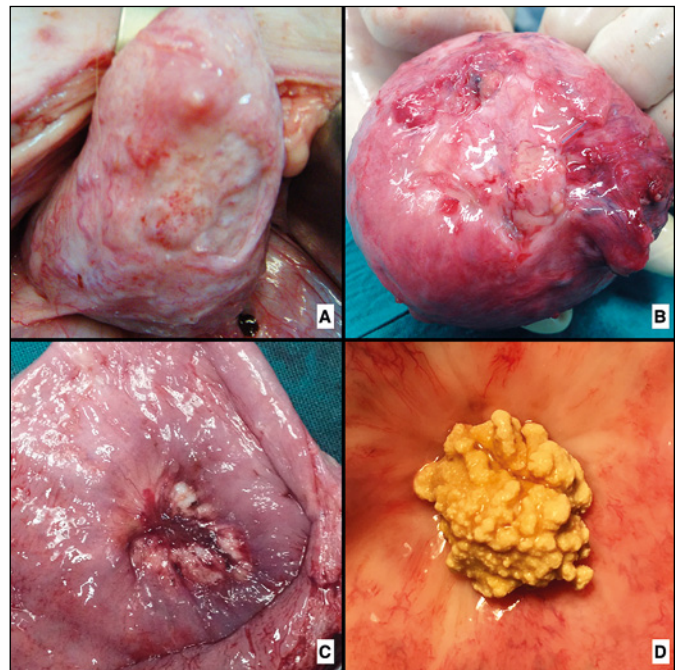


Figure 2. Macroscopic overview 6 weeks post-surgery.

A, B. Mild retraction in Group 1. See the polypropylene marks in figure 2B. **C.** Major retraction in Group 2. **D.** Stone attached to the new bladder wall in Group 1.

lenge [13, 14]. Nowadays, they can only be offered within a clinical trial setting. Since the announcement of the in vitro urinary bladder reconstruction by Atala et al., interest in bladder tissue engineering has increased [15]. To date, only 18 studies have been conducted on humans (approximately 169 patients) using biomaterials and all the other studies have been performed using animal models or based on in vitro tests [6, 16]. The different biomaterials can be classified into naturally derived scaffolds (collagen, alginate, elastin, fibronectin, and hyaluronic acid), acellular tissue matrices (bladder acellular matrix, small intestinal submucosa, dermis, gallbladder, and amniotic membrane), and synthetic scaffolds (silk-

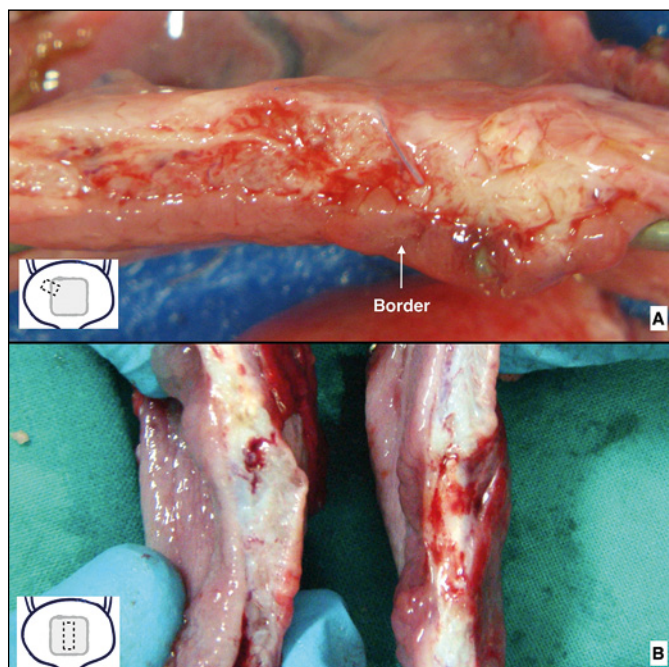


Figure 3. Representative samples of the bladder wall thickness in Group 1. **A.** Transition area between normal bladder and new wall, with the polypropylene marks. **B.** Mid-sagittal plane of the new wall.

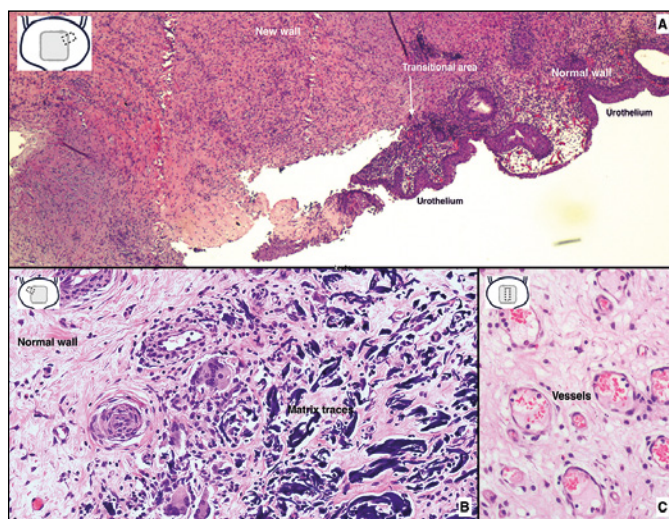


Figure 4. Representative histological overview (hematoxylin and eosin) after 6 weeks in Group 1. **A.** Transition area. Urothelial cells are only present in the normal bladder (right part). **B.** Inflammatory response (left), matrix traces (right). **C.** Vessels in the new wall.

based materials and different types of poly- α -esters as polyglycolic acid) [17]. There are studies that have incorporated exogenous growth factors to the biomaterial in order to promote better results in terms of cellular repopulation and neovascularization.

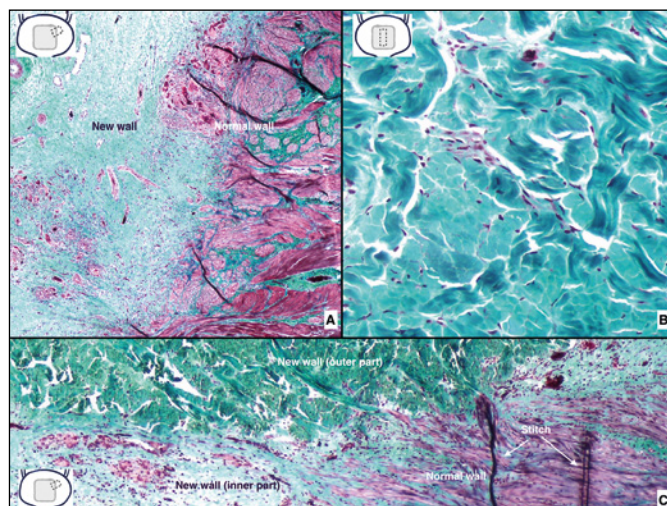


Figure 5. Representative histological overview (Gömöri trichrome) after 6 weeks. **A.** Transition area in group 1. See muscle fibers at the right part trying to emerge to the new wall (left part). **B.** Fibrosis (H-score 3+) in group 2. **C.** Predominantly the new born tissue was in the inner part and the fibrosis was in the outer part, in Group 1.

Incorporating these factors could be debatable, since sometimes their uniform distribution cannot be assured and high doses could affect the healing process [8, 18]. In general, experimental models conducted are complex and they usually require autologous or stem cell cultures and laboratory procedures that are difficult to perform in daily clinical practice. Furthermore, a well-established previous plan is always needed, and thus the use of biomaterials, cell cultures and exogenous growth factors cannot be decided upon the perioperative period (e.g., if the surgeon considers that the intestine cannot be used). Our main reason to perform peritoneocystoplasty with a parietal peritoneum graft was due to the relative ease of the technique and its reproducibility, the capability to do it without cell cultures and other in vitro procedures, and its limited experience as a bladder substitute tissue and in combination with a biomaterial. In 1988, Youssef et al. performed bladder augmentations in rats using a peritoneal graft with a polyglycolic acid mesh [19]. After the first month, the histological analysis showed a transitional epithelium and muscle fibers on the new wall. In 1990, Weingarten et al. performed myoperitoneocystoplasties in six ferrets reporting a median increase of 67% of the bladder capacity, transitional epithelium on the new wall, and no complications [20]. Close et al. published a group of 10 peritoneocystoplasty procedures in a sheep model with poor results. The bladder capacity did not increase, and the histological analysis showed an extensive fibrosis of the new wall [21]. In humans, two

similar studies (21 patients in total) used a peritoneal flap to cover a bladder auto-augmentation [22, 23]. After detrusorrhaphy, a segment of the peritoneum was harvested by making an inverted U incision and tacking it to the bladder to promote the expansion of the exposed urothelium. The results were not satisfactory in functional terms. Our reasons for using an acellular collagen–elastin matrix were its availability in the burn unit of our hospital and the lack of experience in experimental bladder surgery with this type of biomaterial and peritoneum. This matrix acts as a scaffold to promote bladder regeneration, it is biodegradable and easy to handle, and does not induce an immune response. In general, it has better results in urothelial epithelialization rather than in muscle fiber regeneration, therefore it can finally affect the functional outcomes [24].

Our results in a pig model showed that performing a peritoneocystoplasty using the parietal peritoneum graft was not a good choice because the new wall was contracted and was mainly composed of fibrotic tissue. However, when we added an acellular collagen–elastin matrix to the peritoneum graft, the results were better because the retraction rate was lower and the histological analysis showed more signs of regeneration (greater number of vessels and less fibrosis). Nevertheless, in that last group the retraction was also high, and we found a urinary stone attached to the new bladder wall (inner part) in two animals. We did not observe transitional cells on the new wall in any of the groups. We believe that this outcome was probably due to the limited survival time according to other studies [8, 24, 25]. We want to emphasize that in bladder regeneration, not only is the presence of urothelial cells important, but also the muscle fiber regeneration, which we did not properly observe in any of the groups. Previous studies on animals and humans showed good results in terms of urothelial re-epithelialization, but with an inadequate muscle regeneration because it was incomplete, disorganized, not well integrated into the new wall, and without adequate vascularization or innervation [7]. This fact determines the final bladder functionality [24, 26]. Some studies have even performed a specific mechanical analysis to study the tensile strength of the new wall [27, 28]. In terms of the high rate

of the biomaterial degradation after six weeks, we obtained the same results according to previous experiments on bladder and other organs [29]. The functional results did not significantly change between both groups. We believe that the bladder possibly balanced the structural changes and maintained the same maximum volume and pressure. However, our study has its limitations. First, we point out the complex handling of the peritoneum graft that forced us to add the biomaterial in some of the animals. This issue was the reason why both groups were not equal. Perhaps we should have increased the number of animals to strengthen the statistical results. Second, we believe that the survival time of the animals should have been longer in order to promote a better regeneration of the new wall. Third, in order to support the final histological results, we should have added an immunohistochemical staining to study inflammatory response markers or structural proteins (e.g. antibodies against smoothelin, α -actin, desmin, pancytokeratin, uroplakin III, etc.) [8, 28, 30, 31]. Finally, in some cases we faced urethral anatomical limitations, so the functional test could not be properly performed in all animals.

CONCLUSIONS

Currently, the clinical application of biomaterials for performing a regular bladder reconstruction is not immediately forthcoming and experimental methods are usually difficult to apply in daily clinical practice. Performing a peritoneocystoplasty is an easy and safe procedure, uses an autologous graft and does not require any preparation. However, at 6 weeks we observed too much retraction of the new wall. We consider that the histologic results were not good enough although the group with the biomaterial had better outcomes. In the future, further experiments using peritoneum grafts could possibly be conducted but using different biomaterials, growth factors and/or cell cultures. However, replacing the intestine as the gold standard tissue for bladder reconstruction remains a great challenge.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Pokryczyńska M, Jundziłł A, Adamowicz J, Drewa T. Tissue engineering- experimental method of urinary bladder regeneration. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 790-799.
2. Van der Aa F, Joniau S, Van Den Branden M, Van Poppel H. Metabolic changes after urinary diversion. *Adv Urol.* 2011; 2011: 764325.
3. Drewa T, Chłosta P, Czajkowski R. Will tissue-engineered urinary bladders change indications for a laparoscopic cystectomy. *Surg Innov.* 2010; 17: 295-299.

4. Chan YY, Sandlin SK, Kurzrock EA, Osborn SL. The current use of stem cells in bladder tissue regeneration and bioengineering. *Biomedicines*. 2017; 5: pii E4.
5. Drewa T. The promises and challenges of tissue engineering for urinary diversion. *J Urol*. 2012; 188: 351-352.
6. Pokrywczynska M, Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering - an analysis of 131 clinical cases. *Exp Biol Med*. 2014; 239: 264-271.
7. Adamowicz J, Pokrywczynska M, Van Breda SV, Kloskowski T, Drewa T. Concise Review: tissue engineering of urinary bladder; we still have a long way to go. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6: 2033-2043.
8. Pokrywczynska M, Gubanska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 613439.
9. El-Taji OM, Khattak AQ, Hussain SA. Bladder reconstruction: The past, present and future. *Oncol Lett*. 2015; 10: 3-10.
10. Sedrakyan A, Campbell B, Merino JG, Kuntz R, Hirst A, McCulloch P. IDEAL-D: a rational framework for evaluating and regulating the use of medical devices. *BMJ*. 2016; 353: i2372.
11. Haslik W, Kamolz LP, Nathschläger G, Andel H, Meissl G, Frey M. First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns*. 2007; 33: 364-368.
12. Ryszel H, Gazyakan E, Germann G, Ohlbauer M. The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns- a pilot study. *Burns*. 2008; 34: 93-97.
13. Alberti. Whyever bladder tissue engineering clinical applications still remain unusual even though many intriguing technological advances have been reached. *G Chir*. 2016; 37: 6-12.
14. Duel BP, Gonzalez R, Barthold JS. Alternative techniques for augmentation cystoplasty. *J Urol*. 1998; 159: 998-1005.
15. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006; 367: 1241-1246.
16. Gasanz C, Raventós C, Morote J. Current status of tissue engineering applied to bladder reconstruction in humans. *Actas Urol Esp*. 2018.
17. Subramaniam R. Regenerative Medicine in bladder reconstructive surgery. *Eur Urol Suppl*. 2017; 16: 23-29.
18. Song L, Murphy SV, Yang B, Xu Y, Zhang Y, Atala A. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014; 20: 163-172.
19. Youssef M, Chopin D, Leandri J, Auvert J, Loisançe D, Abbou C. Cystoplasty using a resorbable polyglactin prosthesis covered by a free peritoneal flap. *Ann Urol*. 1988; 22: 263-267.
20. Weingarten JL, Cromie WJ, Paty RJ. Augmentation myoperitoneocystoplasty. *J Urol*. 1990; 144: 156-158.
21. Close CE, Dewan PA, Ashwood PJ, Byard RJ, Mitchell ME. Autoaugmentation peritoneocystoplasty in a sheep model. *BJU Int*. 2001; 88: 414-417.
22. Carr MC, Docimo SG, Mitchell ME. Bladder augmentation with urothelial preservation. *J Urol*. 1999; 162: 1133-1136.
23. Oge O, Tekgul S, Ergen A, Kendi S. Urothelium-preserving augmentation cystoplasty covered with a peritoneal flap. *BJU Int*. 2000; 85: 802-805.
24. Glybochko PV, Olefir YV, Alyaev YG, et al. Tissue engineering of urinary bladder using acellular matrix. *Urologia*. 2017; April: 89-94.
25. Roelofs LAJ, de Jonge PKJD, Oosterwijk E, et al. Bladder regeneration using multiple acellular scaffolds with growth factors in a bladder. *Tissue Eng Part A*. 2018; 24: 11-20.
26. Barski D, Gerullis H, Ecke T, et al. Bladder Reconstruction with human amniotic membrane in a xenograft rat model: a preclinical study. *Int J Med Sci*. 2017; 14: 310-318.
27. Tu DD, Chung YG, Gil ES, et al. Bladder tissue regeneration using acellular bi-layer silk scaffolds in a large animal model of augmentation cystoplasty. *Biomaterials*. 2013; 34: 8681-8689.
28. Adamowicz J, Pokrywczynska M, Tworkiewicz J, et al. New Amniotic Membrane Based Biocomposite for Future Application in Reconstructive Urology. *PLoS One*. 2016; 11: e0146012.
29. Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017; 12: 233-246.
30. Lee JN, Chun SY, Lee HJ, et al. Human Urine-derived stem cells seeded surface modified composite scaffold grafts for bladder reconstruction in a rat model. *J Korean Med Sci*. 2015; 30: 1754-1763.
31. Shakhssalim N, Soleimani M, Dehghan MM, et al. Bladder smooth muscle cells on electrospun poly(ϵ -caprolactone)/poly(L-lactic acid) scaffold promote bladder regeneration in a canine model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 75: 877-884. ■

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio en modelo porcino mostraron que realizar una peritoneocistoplastia utilizando un injerto de peritoneo parietal no era una buena elección dado que la nueva pared estaba retraída y mayoritariamente estaba compuesta por tejido fibrótico. Sin embargo, si añadíamos una matriz de colágeno y elastina los resultados eran mejores puesto que la retracción era menor y la histología de la nueva pared mostraba más indicios de regeneración (mayor número de vasos y menor fibrosis). Aun así, también en este grupo la retracción fue más elevada de lo deseable y además en dos animales observamos la formación de litiasis adheridas a la nueva pared. Sobre este último aspecto se debe recordar que no solo hay que tener en cuenta la competencia estructural del tejido sino que deben añadirse los efectos tóxicos de la orina sobre un material heterógeno pudiendo favorecer la litogénesis urinaria. Por otro lado, no observamos la presencia de epitelio de transición en ninguno de los grupos aunque sí estaba presente en los bordes. Creemos que si la supervivencia de los animales hubiera sido mayor probablemente se hubiera acabado epitelizando la nueva pared tal y como reportan otros estudios [49–51]. Por otro lado, la degradación del biomaterial a las 6 semanas fue la esperada de acuerdo a experiencias previas que habían utilizado un material similar en reconstrucciones tanto de vejiga como de otros órganos [52]. Los resultados funcionales no difieren entre grupos a pesar de las diferencias de retracción. Posiblemente la vejiga sea capaz de compensar los cambios estructurales de la nueva pared y por lo tanto se pueda mantener el volumen y presión máximas.

Como limitación principal del estudio, creemos que la estabilización de los animales debería haber sido mayor para favorecer mayor regeneración de la nueva pared. Por otro lado, la debilidad del peritoneo para realizar la cistoplastia hizo que en algunos individuos nos viéramos obligados a añadir el biomaterial para mejorar estructuralmente la nueva pared. Esto hizo que los grupos finalmente fueran desiguales en cuanto a número. Por último, el estudio funcional no se hizo en todos los animales debido a la imposibilidad de cateterizar la uretra en algunos de ellos. En éstos

el sondaje se hizo anterógrado durante la cirugía una vez abierta la vejiga y por lo tanto no fue posible realizar el estudio funcional.

La razón para realizar una peritoneocistoplastia con un injerto de peritoneo parietal fue la simplicidad y reproducibilidad de la técnica, la escasa experiencia en su uso, la capacidad de realización del procedimiento sin utilizar cultivos celulares ni procedimientos previos *in vitro* y la falta de experiencia en combinar dicho injerto en vejiga con un biomaterial. En 1988, Youssef et al. realizaron ampliaciones vesicales en rata utilizando un injerto de peritoneo parietal en combinación con una malla de ácido poliglicólico [53]. Tras el primer mes, el análisis histológico mostró epitelización urotelial y formación de fibras musculares en la nueva pared. La malla se degradó parcialmente y dio estabilidad a la nueva pared, aunque predispuso a la formación de litiasis urinarias. En 1990, Weingarten et al. realizaron mioperitoneocistoplastias en 6 hurones reportando incrementos medios de la capacidad vesical del 67%, epitelización con células transicionales en la nueva pared y ausencia de complicaciones [54]. Close et al. publicaron una serie de 10 peritoneocistoplastias en modelo ovino obteniendo malos resultados, puesto que no se aumentó la capacidad vesical y el análisis histológico mostró una fibrosis mayoritaria de la nueva pared [55]. En humanos, existen dos trabajos similares (21 pacientes en total) en los que se cubre un autoaumento vesical (tras seromiectomía) con un colgajo de peritoneo parietal [56, 57]. En estos estudios los resultados no fueron satisfactorios en términos funcionales (no incremento de capacidad ni *compliance*), especialmente en aquellas vejigas que inicialmente tenían menor capacidad. Nuestra decisión de utilizar una matriz de colágeno y elastina fue la experiencia ya existente con este biomaterial en otros modelos de cirugía vesical experimental y su disponibilidad en nuestro centro (utilizado en la unidad de quemados). El uso de este tipo de material -siempre en cirugía experimental- ha demostrado que puede favorecer la regeneración parcial o total del urotelio, es biodegradable, tiene poca respuesta inmunogénica y es fácil de manipular. Sin embargo,

los resultados publicados en cuanto a regeneración de fibras musculares no son buenos, comprometiendo así la correcta funcionalidad vesical [50].

La búsqueda de una técnica, material y grupo celular adecuado para realizar una ampliación o sustitución vesical funcional es compleja puesto que no solo se debe tener en cuenta la competencia estructural del tejido o la respuesta biológica natural de éste, sino también los efectos tóxicos de la orina. Como ya se ha comentado anteriormente, en cuanto a la formación del nuevo tejido no solo es importante una regeneración del urotelio sino también del músculo liso. La regeneración urotelial parece más sencilla y se ha logrado con muchas combinaciones, tanto de material aislado como combinado con cultivos celulares. El reto más importante es la regeneración muscular pues ésta suele ser solo parcial, estructuralmente desorganizada, no está bien integrada con el resto de la vejiga o bien carece de vascularización e inervación. En muchos estudios, tanto en animales como en humanos, dicha regeneración muscular es aberrante, insuficiente o directamente es un tejido fibroso retraído, provocando que la vejiga no sea funcional. Éste es uno de los principales motivos por los que la ingeniería tisular vesical clínica es anecdótica. Hoy en día si hubiera que elegir con la evidencia existente una técnica para realizar una ampliación vesical en el humano (plantear la sustitución ya sería más complejo), probablemente habría que escoger una matriz acelular o bien un polímero sintético y adherirle *in vitro* células uroteliales y musculares lisas autógenas (o bien células madre), cubriendo todo el injerto con epiplon en el momento de la cirugía. El seguimiento debería ser a largo plazo, estricto, incluyendo pruebas de imagen, urodinámicas e, idealmente, biopsias de control.

En resumen, podemos afirmar que a pesar del desarrollo de la terapia celular y del progreso en la fabricación de biomateriales, la aplicación clínica real de éstos en la reconstrucción vesical no es inminente y continúa siendo un reto a día de hoy. Apenas hay estudios en humanos que realicen reconstrucciones vesicales utilizando biomateriales. La gran mayoría de trabajos están basados en modelos animales o bien son exclusivamente *in vitro*. En general, los modelos experimentales

planteados son complejos dado que requieren cultivos celulares con células autógenas o células madre así como procedimientos de laboratorio difíciles de trasladar a la práctica clínica habitual. Además requieren de una planificación previa importante, por lo que su uso no puede ser decidido de forma intraoperatoria. Por lo tanto, es preciso realizar más estudios, aumentar el número de sujetos incluidos, el tiempo de seguimiento y estandarizar las pruebas funcionales de control. Solo así se podrá disponer de un biomaterial -con o sin cultivo celular añadido- que desplace el tejido intestinal como *gold standard* de sustituto vesical.

CONCLUSIONES

1. La adición de una matriz de colágeno y elastina a una peritoneocistoplastia favorece que la nueva pared presente menor retracción. No observamos diferencias respecto a la existencia de seroma, infección o falta de integración.
2. La adición de una matriz de colágeno y elastina a una peritoneocistoplastia favorece la regeneración tisular observándose a las 6 semanas mayor neoangiogénesis y menor fibrosis en la nueva pared. Sin embargo, no observamos epitelización por células transicionales. A la sexta semana el biomaterial se degradó casi por completo.
3. La adición de una matriz de colágeno y elastina a una peritoneocistoplastia no mejoró el resultado funcional en el estudio de presión/volumen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pokrywczyńska M, Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering - an analysis of 131 clinical cases. *Exp Biol Med.* 2014;239:264-271.
2. El-Taji OM, Khattak AQ, Hussain SA. Bladder reconstruction: The past, present and future. *Oncol Lett.* 2015;10:3-10.
3. Alberti. Whyever bladder tissue engineering clinical applications still remain unusual even though many intriguing technological advances have been reached. *G Chir.* 2016;37:6-12.
4. Pokrywczyńska M, Jundziłł A, Adamowicz J, Drewa T. Tissue engineering - experimental method of urinary bladder regeneration. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:790-799.
5. Van der Aa F, Joniau S, Van Den Branden M, Van Poppel H. Metabolic changes after urinary diversion. *Adv Urol.* 2011;2011:764325.
6. Bohne AW, Urwiller KL. Experience with urinary bladder regeneration. *J Urol.* 1957;77:725-732.
7. Atala A. Regenerative bladder augmentation using autologous tissue-when will we get there? *J Urol.* 2014;191:1204-1205.
8. Adamowicz J, Pokrywczyńska M, Van Breda SV, Kloskowski T, Drewa T. Concise Review: Tissue Engineering of Urinary Bladder; We Still Have a Long Way to Go. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6:2033-2043.
9. Gasanz C, Raventós C, Morote J. Current status of tissue engineering applied to bladder reconstruction in humans. *Actas Urol Esp.* 2018.
10. Franck D, Gil ES, Adam RM et al. Evaluation of silk biomaterials in combination with extracellular matrix coatings for bladder tissue engineering with primary and pluripotent cells. *PLoS One.* 2013;8:e56237.

11. Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull.* 2011;97:81-104.
12. Singh A, Bivalacqua TJ, Sopko N. Urinary Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *Sex Med Rev.* 2018;6:35-44.
13. Drewa T. The promises and challenges of tissue engineering for urinary diversion. *J Urol.* 2012;188:351-352.
14. Subramaniam R. Regenerative Medicine in Bladder Reconstructive Surgery. *European Urology Supplements.* 2017.
15. Kanematsu A. Regenerative medicine for urological tissues: Updated review 2018. *Int J Urol.* 2018.
16. Giri TK, Alexander A, Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Ajazuddin. Current status of stem cell therapies in tissue repair and regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018.
17. Drewa T, Sir J, Czajkowski R, Wozniak A. Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodeling in vivo after bladder augmentation using in vitro engineered graft. *Transplant Proc.* 2006;38:133-135.
18. Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science.* 2003;300:913-916.
19. Chan YY, Sandlin SK, Kurzrock EA, Osborn SL. The Current Use of Stem Cells in Bladder Tissue Regeneration and Bioengineering. *Biomedicines.* 2017;5.
20. Smolar J, Salemi S, Horst M, Sulser T, Eberli D. Stem Cells in Functional Bladder Engineering. *Transfus Med Hemother.* 2016;43:328-335.
21. Drewa T. Using hair-follicle stem cells for urinary bladder-wall regeneration. *Regen Med.* 2008;3:939-944.
22. Adamowicz J, Kowalczyk T, Drewa T. Tissue engineering of urinary bladder - current state of art and future perspectives. *Cent European J Urol.* 2013;66:202-206.

23. Smolar J, Horst M, Sulser T, Eberli D. Bladder regeneration through stem cell therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18:525-544.
24. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861-872.
25. Van Baal JO, Van de Vijver KK, Nieuwland R et al. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell.* 2017;49:95-105.
26. Melichar B, Freedman RS. Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;12:3-17.
27. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1351-1365.
28. Blackburn SC, Stanton MP. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg.* 2014;23:326-330.
29. Lam Van Ba O, Aharony S, Loutochin O, Corcos J. Bladder tissue engineering: A literature review. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014
30. Tsulukidze A, Murvanidze D, Dvali R, Ivashchenko G. Formation of a bladder by a plastic shell after total cystectomy. *Br J Urol.* 1964;36:102-105.
31. Tsulukidze AP, Murvanidze DD, Dvali RF, Ivashchenko G. Formation of a reservoir for urine from plastmass after total cystectomy. *Urol Mosc.* 1961;26:46-51.
32. Tsulukidze AP, Murvanidze DD, Ivashenko G, Dvali RF. Further modifications in the formation of the “urinary bladder” around a temporary endo-prosthesis made of plastmass. *Urol Mosc.* 1961;26:28-29.
33. Tsuji I, Kuroda K, Fujieda J, Shiraishi Y, Kassai T, Shida H. A clinical and experimental study on cystoplasty not using the intestine. *J Urol.* 1963;89:214-225.

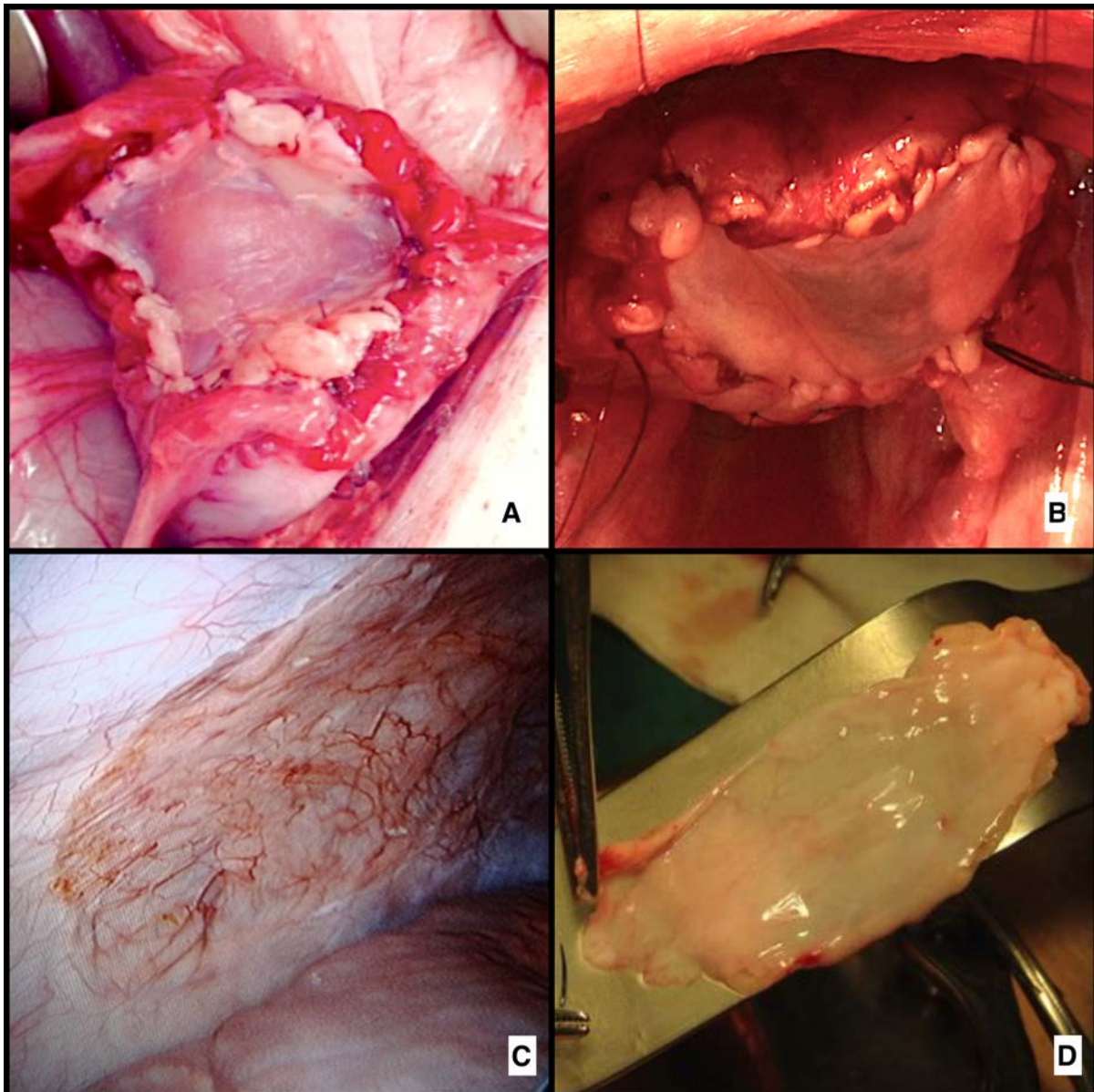
34. Orikasa S. Study on regeneration and reconstruction of the urinary tract. V. Experimental and clinical cystoplasty using alcohol treated gelatin sponge. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1967;58:449-464.
35. Kelâmi A. Duraplasty of the urinary bladder--results after two to six years. *Eur Urol*. 1975;1:178-181.
36. Günther M, Pietruschka U, Siegel W, Erdmann T. Use of the dura in the surgical treatment of bladder cancer. *Z Urol Nephrol*. 1979;72:473-482.
37. Kakimoto S, Sakai H, Kubota S, Kondo A, Kishikawa M. Partial cystectomy for bladder carcinoma: lyophilized human dura as a bladder wall substitute. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1989;80:22-27.
38. Taguchi H, Ishizuka E, Saito K. Cystoplasty by regeneration of the bladder. *J Urol*. 1977;118:752-756.
39. Fujita K. The use of resin-sprayed thin paper for urinary bladder regeneration. *Invest Urol*. 1978;15:355-357.
40. Månsson W, Harzmann R. Clinical experience with an alloplastic stoma prosthesis (Biocarbon) for urinary conduits and cutaneous ureterostomy. *Scand J Urol Nephrol*. 1988;22:223-226.
41. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367:1241-1246.
42. Caione P, Boldrini R, Salerno A, Nappo SG. Bladder augmentation using acellular collagen biomatrix: a pilot experience in exstrophic patients. *Pediatr Surg Int*. 2012;28:421-428.
43. Kates M, Singh A, Matsui H et al. Tissue-engineered urinary conduits. *Curr Urol Rep*. 2015;16:8.
44. Sedrakyan A, Campbell B, Merino JG, Kuntz R, Hirst A, McCulloch P. IDEAL-D: a rational framework for evaluating and regulating the use of medical devices. *BMJ*. 2016;353:i2372.

45. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 2010;7:229-258.
46. Haslik W, Kamolz LP, Nathschläger G, Andel H, Meissl G, Frey M. First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns*. 2007;33:364-368.
47. Min JH, Yun IS, Lew DH, Roh TS, Lee WJ. The use of matriderm and autologous skin graft in the treatment of full thickness skin defects. *Arch Plast Surg*. 2014;41:330-336.
48. Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, Ohlbauer M. The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns--a pilot study. *Burns*. 2008;34:93-97.
49. Pokrywczynska M, Gubanska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions. *Biomed Res Int*. 2015;2015:613439.
50. Glybochko PV, Olefir YV, Alyaev YG et al. Tissue engineering of urinary bladder using acellular matrix. *Urologiia*. 2017:89-94.
51. Roelofs LAJ, de Jonge PKJD, Oosterwijk E et al. Bladder Regeneration Using Multiple Acellular Scaffolds with Growth Factors in a Bladder. *Tissue Eng Part A*. 2017.
52. Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12:233-246.
53. Youssef M, Chopin D, Leandri J, Auvert J, Loisançe D, Abbou C. Cystoplasty using a resorbable polyglactin prosthesis covered by a free peritoneal flap. *Ann Urol*. 1988;22:263-267.
54. Weingarten JL, Cromie WJ, Paty RJ. Augmentation myoperitoneocystoplasty. *J Urol*. 1990;144:156-158.
55. Close CE, Dewan PA, Ashwood PJ, Byard RJ, Mitchell ME. Autoaugmentation peritoneocystoplasty in a sheep model. *BJU Int*. 2001;88:414-417.

56. Carr MC, Docimo SG, Mitchell ME. Bladder augmentation with urothelial preservation. *J Urol.* 1999;162:1133-6; discussion 1137.
57. Oge O, Tekgul S, Ergen A, Kendi S. Urothelium-preserving augmentation cystoplasty covered with a peritoneal flap. *BJU Int.* 2000;85:802-805.

ANEXOS

Figure 1. Representative macroscopic steps of the implantation procedure.



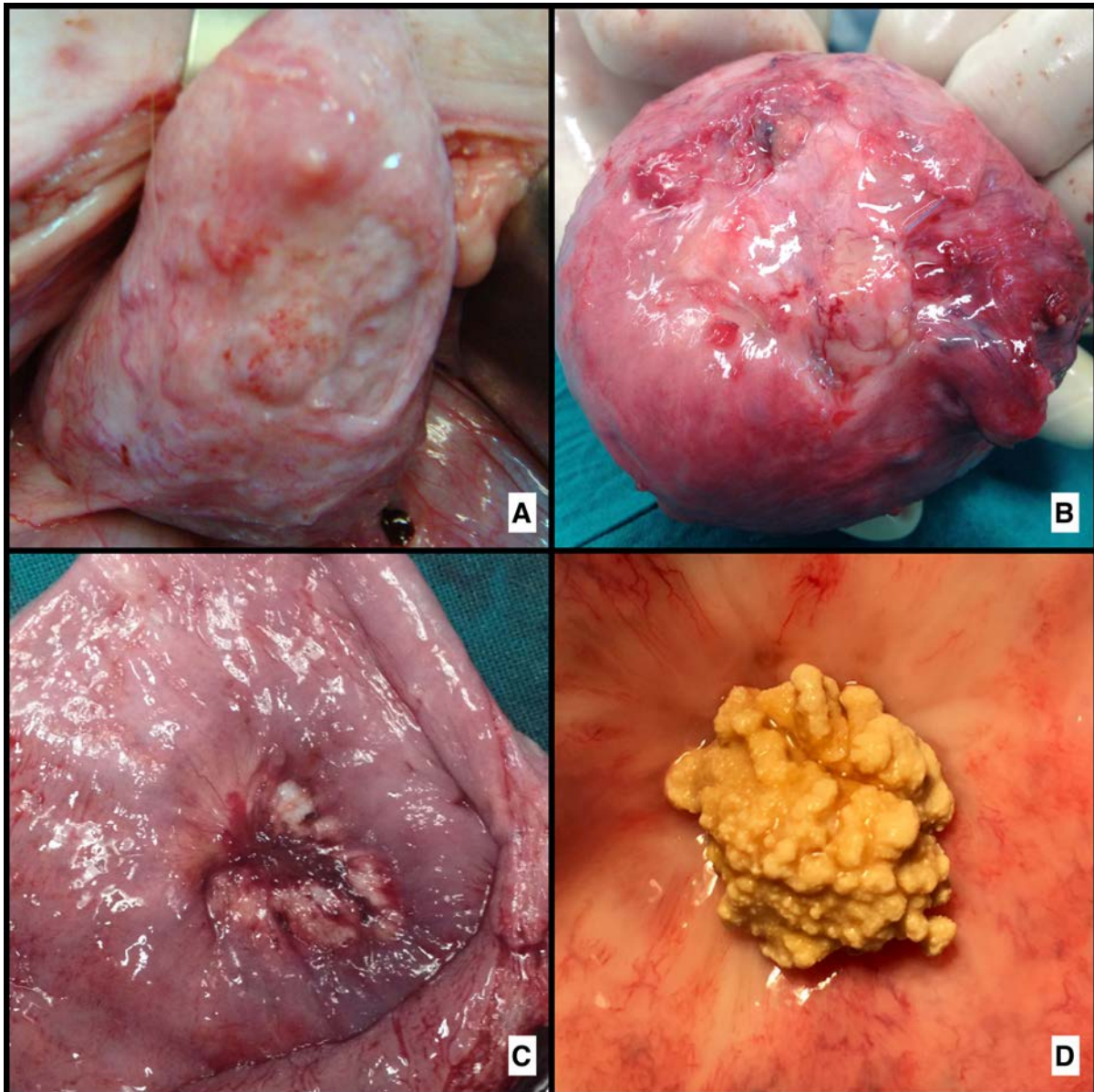
1a. Peritoneum + biomaterial cystoplasty.

1b. Peritoneum cystoplasty.

1c. Anterior abdominal wall after removing the peritoneum graft.

1d. Peritoneum graft.

Figure 2. Macroscopic overview 6 weeks post-surgery.

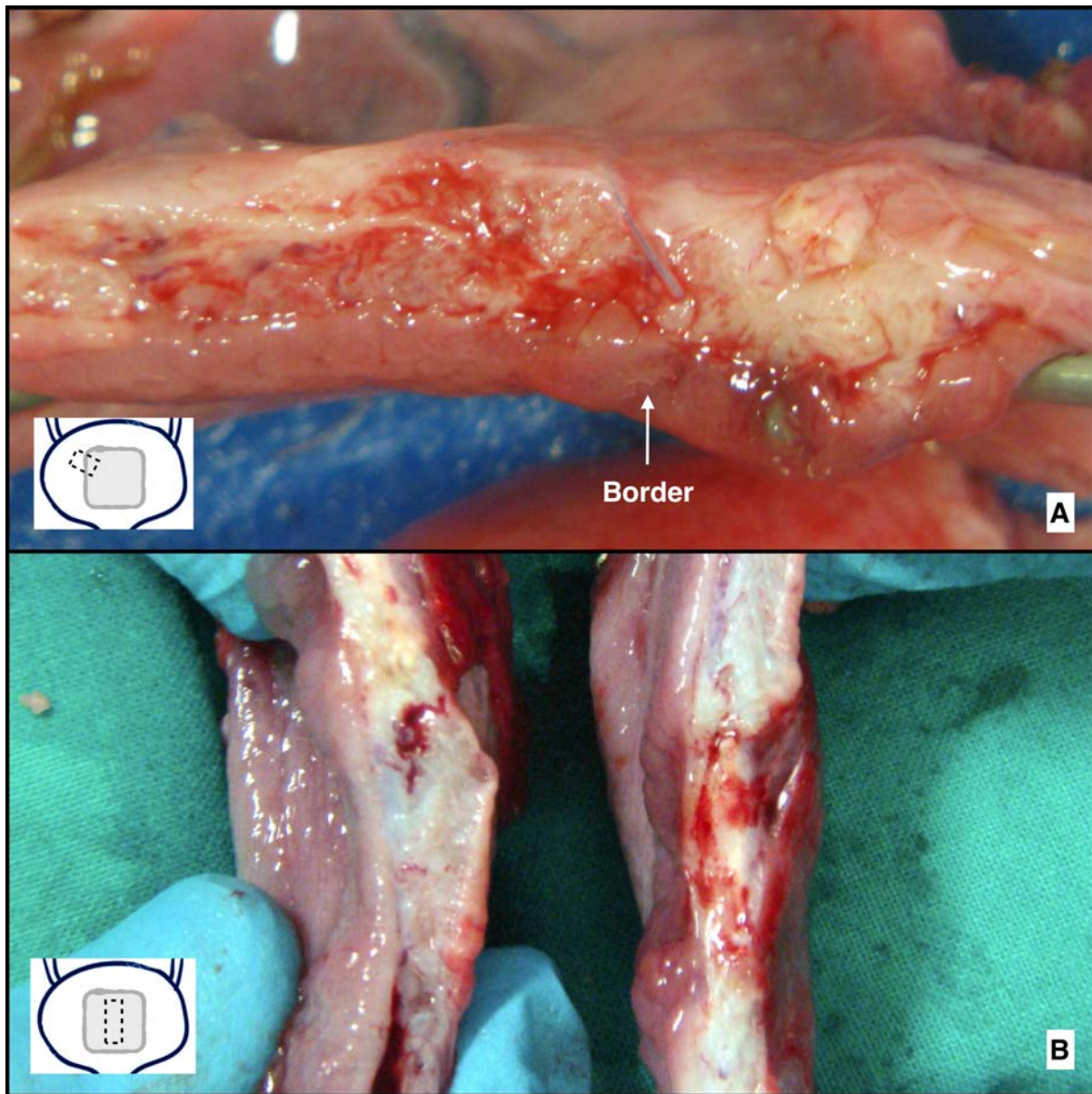


2a, 2b. Mild retraction in group 1. See the polypropylene marks in figure 2b.

2c. Major retraction in group 2.

2d. Stone attached to the new bladder wall in group 1.

Figure 3. Representative samples of the bladder wall thickness in group 1.

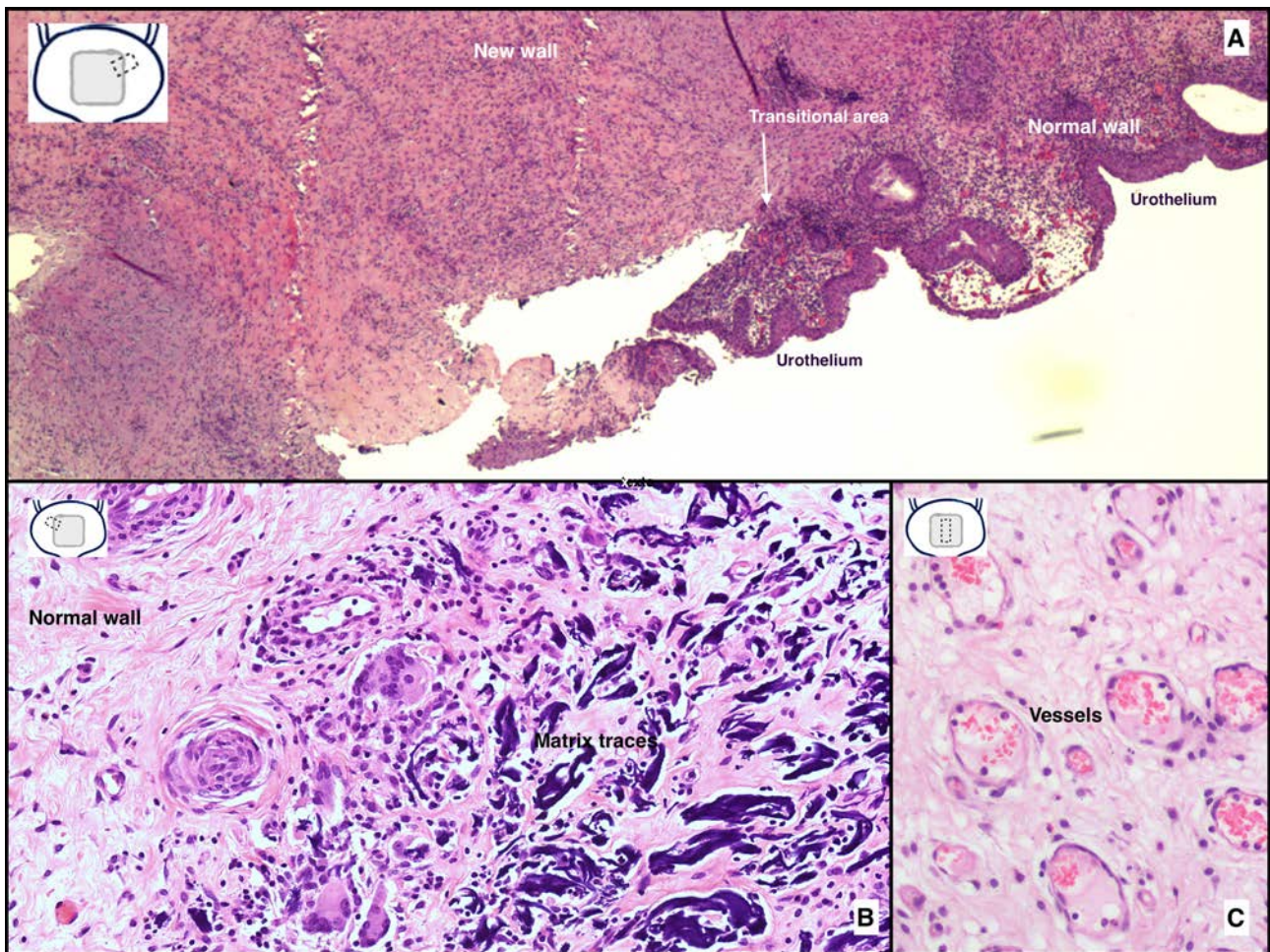


3a. Transition area between normal bladder and new wall, with the polypropylene marks.

3b. Mid-sagittal plane of the new wall.

Figure 4. Representative histological overview (hematoxylin and eosin) after 6 weeks in group

1.

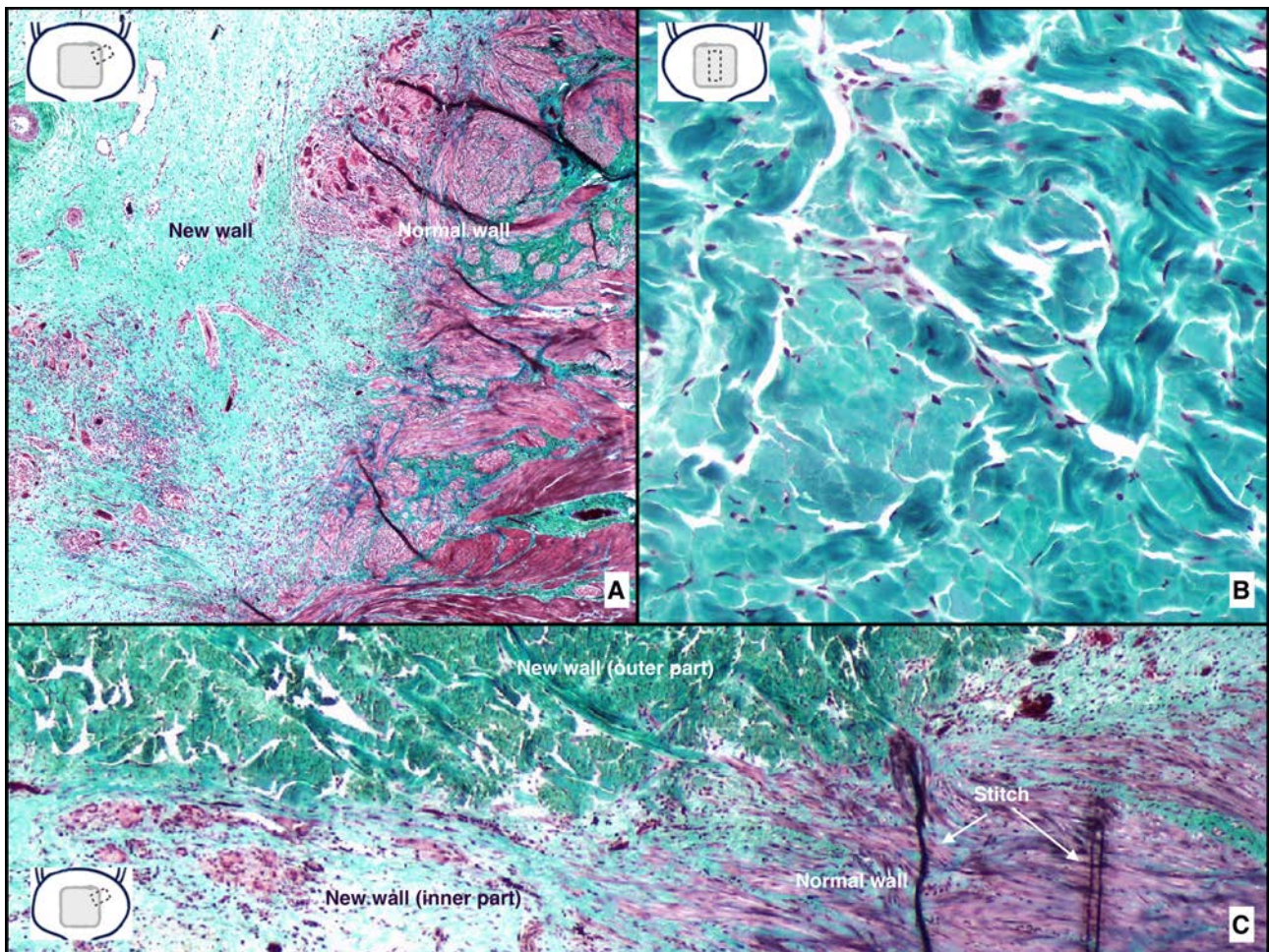


4a. Transition area. Urothelial cells are only present in the normal bladder (right part).

4b. Inflammatory response (left), matrix traces (right).

4c. Vessels in the new wall.

Figure 5. Representative histological overview (Gömöri trichrome) after 6 weeks.



5a. Transition area in group 1. See muscle fibers at the right part trying to emerge to the new wall (left part).

5b. Fibrosis (H-score 3+) in group 2.

5c. Predominantly the new born tissue was in the inner part and the fibrosis was in the outer part, in group 1.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**