

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Thaís Gomes Casali

Estudo morfológico e histoquímico sobre o efeito tissular na pele do prepúcio à administração tópica de estradiol ou testosterona no pré-operatório de pacientes com hipospádia: ensaio clínico randomizado duplo-cego

**Juiz de Fora
2019**

Thaís Gomes Casali

Estudo morfológico e histoquímico sobre o efeito tissular na pele do prepúcio à administração tópica de estradiol ou testosterona no pré-operatório de pacientes com hipospádia: ensaio clínico randomizado duplo-cego

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Murillo Bastos Netto
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes

**Juiz de Fora
2019**

Thaís Gomes Casali

Estudo morfológico e histoquímico sobre o efeito tissular na pele do prepúcio à administração tópica de estradiol ou testosterona no pré-operatório de pacientes com hipospádia: ensaio clínico randomizado duplo-cego

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Murillo Bastos Netto – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes Molina
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Cleber Soares Junior
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Marília de Pádua Dornelas Correa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Paulo Roberto da Costa
Universidade Federal de Minas Gerais

Aos meus filhos, Gabriel e Miguel...
Que vocês tenham prazer em estudar
assim como sua mãe e seu pai

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Gabriel e Miguel, por me inspirarem a ser uma pessoa cada dia melhor. Iniciei o doutorado antes mesmo de ser mãe, e esse trabalho tem o propósito de ser um exemplo de determinação para meus filhos, para que nunca desistam dos seus objetivos. Ao meu marido, Thiago, por não me deixar desanimar, por me ajudar com as crianças em todos os momentos, por compartilhar desse grande interesse pela pesquisa. Aos meus pais, parentes e amigos, pela força e presença em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Murillo Bastos Netto, pela oportunidade concedida, por acreditar em mim mesmo sabendo que seria difícil conciliar a maternidade e a pesquisa, pela atenção e paciência mesmo nos meus momentos de maior ansiedade.

À Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon, pela parceria, pelo carinho. Coordenadora e amiga que esteve presente em todos os momentos do trabalho. Por compartilharmos da mesma dualidade “mãe x pesquisadora”, seu apoio foi fundamental para que eu prosseguisse.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes, o primeiro com quem falei sobre o desejo de iniciar o doutorado, pela orientação e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. José de Bessa Júnior, pelos ensinamentos estatísticos.

À Ana Paula Duque, doutoranda em Farmácia, sempre disponível e com um grande sorriso no rosto, pela ajuda fundamental na elaboração do método e na análise das lâminas de picrossirius. Ao Laboratório de Farmácia e Bioquímica da UFMG e de Genética da UFJF, que me ajudaram na análise das lâminas de picrossirius, demonstrando a importância da cumplicidade entre os pesquisadores.

A todos os pais e responsáveis pelas crianças que participaram deste estudo, obrigada pelo respeito e confiança.

Aos colegas do Núcleo interdisciplinar de Pesquisa em Urologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Prof. Dr. André Avarese de Figueiredo, por participar das discussões científicas e acrescentar com as suas sugestões. Estendo meus agradecimentos especiais a todos os acadêmicos de medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), que tanto me auxiliaram na coleta de dados.

RESUMO

O uso pré-operatório da testosterona tópica na correção da hipospádia visa aumentar o tamanho peniano de forma a obter melhores resultados cirúrgicos. O uso tópico do estradiol vem sendo associado à melhora da qualidade da pele em outros sítios anatômicos, mas seus efeitos ainda não foram bem esclarecidos em meninos com hipospádia. Este estudo procura avaliar os efeitos primários da administração hormonal tópica na espessura da epiderme e na expressão do colágeno dérmico na pele do prepúcio de meninos com hipospádia. Pacientes foram randomizados em três grupos de acordo com a terapia hormonal empregada: GT: Grupo Testosterona; GE: Grupo Estradiol; GC: Grupo Controle, com emprego de creme base. Fragmentos de prepúcio foram ressecados, fixados e seccionados para análise histológica. Para cada amostra, foram analisadas a espessura da epiderme e a expressão de colágeno dérmico através de análise específica de computador, considerando $p < 0,05$. Trinta e três pacientes com média de idade de $4,01 \pm 2,92$ anos foram incluídos. A classificação da hipospádia foi semelhante entre os grupos. A média da espessura da epiderme e da expressão do colágeno tipo I no GE foi maior que nos outros grupos. A expressão do colágeno tipo III foi semelhante entre os grupos. O uso do estradiol tópico antes da cirurgia de hipospádia está associado ao aumento da espessura da epiderme e do colágeno dérmico no prepúcio.

PALAVRAS-CHAVE

Hipospádia. Crianças. Estradiol. Testosterona. Cicatrização.

ABSTRACT

The use of preoperative topical testosterone stimulation prior to hypospadias correction aims to increase penile size and achieve better surgical results. Topical estradiol has been shown to improve the quality of skin in other sites, but its use in boys with hypospadias has not yet been elucidated. This study aims to evaluate the primary effects of topical hormone therapy in epidermal thickness and collagen distribution in skin of prepuce before hypospadias surgery. Patients were randomized into three groups according to the topical hormone used: TG: Testosterone ointment; EG: Estradiol ointment; CG: Neutral base ointment. Fragments of foreskin were excised, fixed and then sectioned for histology. For each sample, epidermal thickness and dermal collagen expression was measured by specific computer analysis, p-values of <0.05. Thirty-three patients with a mean age of 4.01 ± 2.92 years were included. Hypospadias classification was similar in all three groups. Mean epidermal thickness and collagen type I expression in EG were greater than those of the other groups. Collagen type III expression was similar in all groups. Use of topical estradiol before hypospadias surgery lead to greater epidermal thickness and increased dermal collagen expression in foreskin.

KEYWORDS

Hypospadias. Children. Estradiol. Testosterone. Wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fotomicrografia ilustrativa dos cinco componentes histológicos do prepúcio, identificados por números.....	19
Figura 2	Fragmento de prepúcio fixo em superfície rígida.....	24
Figura 3	Fragmento de prepúcio clivado e dimensionado.....	25
Figura 4	Demonstração do software para medida da epiderme, com os 5 traçados dispostos em cada campo, que indicam medidas da espessura da epiderme, em microscopia óptica com 20 x de aumento.....	26
Figura 5	Fotomicrografia esquemática da análise tecidual do prepúcio, onde se identifica a epiderme supra-papilar (linhas), papilas dérmicas (círculos), cristas epidérmicas (setas) e derme reticular (retângulos). HE, 200X.....	27
Gráfico 1	Valores da MEE do prepúcio de pacientes, medida em micrômetros, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).....	31
Figura 6	Análise da espessura da epiderme(seta). A: Grupo Testosterona. B: Grupo Estradiol. C: Grupo Controle. HE, 200X.....	31
Figura 7	Intensidade de fibras colágenas tipo I e III. A: Grupo Testosterona. B: Grupo Estradiol. C: Grupo Controle. Picrossirius, polarização 200X.....	32
Gráfico 2	Expressão do colágeno tipo I no prepúcio de pacientes, medida em pixels, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).....	33
Gráfico 3	Expressão do colágeno tipo III no prepúcio de pacientes, medida em pixels, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	10
2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	11
2.3 TERAPIA HORMONAL PRÉ-OPERATÓRIA.....	12
2.3.1 A FAVOR DA TESTOSTERONA.....	13
2.3.2 CONTRA A TESTOSTERONA.....	14
2.3.3 O ESTRADIOL TÓPICO NO PRÉ-OPERATÓRIO.....	16
2.4 A IMPORTÂNCIA DO PREPÚCIO NA TÉCNICA OPERATÓRIA	17
2.5 HISTOLOGIA DO PREPÚCIO.....	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 PACIENTES E MÉTODOS	22
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	24
4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	26
4.3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA.....	28
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 RESULTADOS	30
5.1 ESPESSURA DA EPIDERME.....	30
5.2 EXPRESSÃO DO COLÁGENO.....	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICES	51
ANEXO.....	72

1 INTRODUÇÃO

A hipospádia é anomalia congênita caracterizada pela posição ectópica do meato uretral. Sua correção cirúrgica é um desafio, especialmente nos casos de meninos com pênis de tamanho muito reduzido. Em decorrência disso, muitos cirurgiões optam pelo estímulo pré-operatório com testosterona, com o objetivo de aumentar o tamanho peniano e assim, facilitar a técnica cirúrgica (DEVINE e HORTON, 1977).

Entretanto, o papel da terapia hormonal pré-operatória ainda não está bem estabelecido na literatura. Há muitas controvérsias quanto à posologia e forma de administração da testosterona, além de recentes estudos demonstrarem que ela está associada ao prejuízo no reparo tecidual (GILLIVER *et al.*, 2003; GORDUZA *et al.*, 2011). O estradiol tópico, por sua vez, proporciona benefícios relacionados à qualidade da pele em situações diversas (ASHCROFT *et al.*, 1999; ASHCROFT e ASHWORTH, 2003; VERDIER-SEVRAIN *et al.*, 2004; SON *et al.*, 2005), porém seu uso no prepúcio de pacientes com hipospádia ainda não foi elucidado.

A boa cicatrização da ferida é importante não apenas devido a questões estéticas, mas sobretudo devido à necessidade de confecção de enxertos e retalhos cutâneos para a reconstrução peniana, com o objetivo de evitar complicações relacionadas ao reparo tecidual, como fístulas e deiscências. Embora haja mais de 250 técnicas para a correção da hipospádia, sabemos que dois fatores são primordiais para o sucesso cirúrgico: a habilidade do cirurgião quanto à técnica empregada e a disponibilidade de tecido de boa qualidade para a correção do defeito (VAN DER HORST e DE WALL, 2017).

Esse estudo visa avaliar os efeitos do estradiol e testosterona comparados com o controle quanto à espessura da epiderme e à expressão do colágeno na pele do prepúcio, quando administrados antes da cirurgia em crianças com hipospádia. Nossa hipótese é que a administração hormonal tópica possa determinar alterações histológicas significativas na pele do prepúcio desses pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A hipospádia constitui a mais frequente anomalia da genitália externa masculina. É caracterizada pelo desenvolvimento incompleto da uretra, com disposição do meato uretral na face inferior do pênis (face ventral) e não na extremidade da glândula. Ocorre em cerca de 1 a cada 200 nascimentos masculinos (LUND *et al.*, 2009). Acomete a porção distal do pênis em aproximadamente 70% dos casos. Em 30% dos casos a hipospádia é mais proximal e habitualmente de tratamento mais complexo (VAN DER HORST e DE WALL, 2017).

É considerada doença de etiologia multifatorial. Acredita-se que a hipospádia seja resultado do desenvolvimento incompleto da uretra, causada por a) produção androgênica anormal pelo testículo fetal, b) sensibilidade anormal ao estímulo androgênico em tecidos alvo no pênis e/ou c) término precoce do estímulo androgênico causado por atrofia das células de Leydig nos testículos (BASKIN *et al.*, 2001).

Sabe-se que os androgênios estimulam o desenvolvimento da genitália externa masculina. Entretanto, defeitos no metabolismo desses hormônios e/ou no receptor dos mesmos ainda não foram, com clareza, explorados por estudos específicos. Assim, nem todos os casos de hipospádia podem ser explicados (BASKIN, 2000).

Estudos sugerem diferenças étnicas e geográficas na prevalência da hipospádia, sendo mais observada nos caucasianos que nos negros ou nativos americanos (LOWRY *et al.*, 1986).

2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Quanto mais proximal for a localização anatômica do meato uretral, maior a gravidade da hipospádia. A maioria das crianças com hipospádia não apresenta outros sinais de baixa masculinização ou malformação congênita (WEIDNER *et al.*, 1999). Dessa forma, a hipospádia se apresenta de forma isolada na maioria das crianças, porém, criptorquidia e micropênis podem estar associados (HSIEH *et al.*, 2008).

A criptorquidia pode ocorrer em 5% a 18% dos casos. A prevalência de hipospádia associada à criptorquidia é maior quanto menor o peso ao nascimento. Nesses casos, a fertilidade do indivíduo pode ser prejudicada (LUND *et al.*, 2009) e é importante investigar e afastar a presença de distúrbios de diferenciação sexual.

O pênis com hipospádia difere do normal pela ausência da uretra na extremidade distal da glândula e por apresentar pele fina e atrófica em sua superfície ventral. O quadro é, na maioria das vezes, acompanhado de curvatura peniana ventral congênita (“chordee”), que se manifesta em decorrência de tecido fibroso ventral (resquício do corpo esponjoso hipoplásico) ou de desproporção dos corpos cavernosos. O prepúcio é deficiente em sua face ventral. A presença de prepúcio exuberante e redundante apenas na face dorsal é, muitas vezes, o único sinal percebido pelos pais. Esta anomalia confere ao prepúcio um aspecto de capuchão, e sua correção cirúrgica é importante pela questão funcional e estética. Inúmeras técnicas utilizam a pele prepucial, tanto na substituição da uretra quanto na cobertura e proteção da uretra reconstruída com outro tecido (SNODGRASS e BUSH, 2016).

Entre as alterações neurovasculares, podemos encontrar déficit de vascularização no pênis, assim como menor distribuição nervosa na glândula, em comparação com as características penianas normais (BASKIN, 2000).

Do ponto de vista funcional, a topografia ectópica do meato uretral implica num jato urinário não direcionável para frente. Assim, muitas crianças são obrigadas a urinar sentadas, o que pode levar a grande problema psicológico. A curvatura peniana, dependendo de sua angulação, também pode acarretar em dificuldade para penetração durante o coito e comprometer a fertilidade por dificuldade no momento da ejaculação.

2.3 TERAPIA HORMONAL PRÉ-OPERATÓRIA

Sabe-se que parâmetros biométricos penianos, como pequeno tamanho da glândula ou estreita placa uretral, são associados ao maior risco de complicações locais pós-operatórias (DA SILVA *et al.*, 2014; BUSH *et al.*, 2015). Entretanto, há um crescimento peniano apenas moderado nos primeiros anos de vida. Assim, o adiamento da cirurgia com o objetivo de aguardar o crescimento peniano não deve ser recomendado (MANZONI *et al.*, 2004).

Por esse motivo, alguns cirurgiões defendem o uso da testosterona antes do procedimento cirúrgico a fim de estimular o crescimento peniano e facilitar a técnica cirúrgica. Uma pesquisa envolvendo os associados da American Academy of Pediatrics – Section of Urology (MALIK e LIU, 2014) demonstrou que 78% dos mesmos indicavam o uso da testosterona pré-operatória, principalmente nos casos de micropênis, circunferência diminuída da glândula, menor espessura da placa uretral ou hipospádia proximal. O micropênis é definido como o comprimento peniano abaixo do terceiro percentil (WRIGHT *et al.*, 2013).

Ainda não há consenso sobre a melhor dose ou via de administração da testosterona no pré-operatório da cirurgia de hipospádia, podendo ser utilizada por via tópica a 1% ou 2%, duas vezes ao dia por 4 a 6 semanas. A testosterona também pode ser utilizada por via intramuscular em doses de 25 mg ao mês, por 3 meses antes da cirurgia, ou ainda, dose única de 2 mg/kg um mês antes do procedimento (WONG e BRAGA, 2015). Gonadotrofina coriônica, outra opção terapêutica, pode ser empregada por via intramuscular em doses de 250 UI em meninos com menos de um ano, e de 500 UI entre 1 a 5 anos, aplicadas duas vezes por semana por cinco semanas (NETTO *et al.*, 2013).

Embora vários estudos tenham comparado o uso intramuscular e tópico da testosterona, nenhuma diferença significativa tem sido apresentada entre as duas vias de administração no que diz respeito aos resultados na biometria peniana (WRIGHT *et al.*, 2013; VAN DER HORST e DE WALL, 2017). Nerli *et al.* (2009) demonstraram que tanto a testosterona parenteral quanto tópica são eficazes em aumentar o tamanho peniano no pré-operatório. Em seu estudo, um grupo recebeu tratamento tópico por 3

semanas e outro recebeu tratamento intramuscular uma vez ao mês por 3 meses, não havendo diferença estatística quanto ao tamanho peniano alcançado entre os grupos.

Também são limitados e pouco conclusivos os estudos que avaliam os efeitos do uso da testosterona no pré-operatório desses pacientes. Em revisão sistemática conduzida por Netto *et al.*, (2013) onde foram comparados 14 ensaios clínicos com 473 pacientes sendo 300 tratados com testosterona, os autores concluíram que esse tema ainda carece de maior investigação, visto que muitos dos trabalhos levantados apresentam pequena amostra, falta de padronização no uso do hormônio e resultados pouco convincentes.

Duas correntes distintas atuam frente ao uso da testosterona antes da cirurgia:

2.3.1 A FAVOR DA TESTOSTERONA:

A primeira corrente defende o uso de andrógenos, afirmando que o aumento do tamanho peniano facilitaria o ato cirúrgico, possibilitando uma cirurgia mais precoce e, assim, diminuindo o estresse psicológico aos pais e à criança. Koff e Jayanthi (1999) realizaram estudo em que demonstraram menor incidência de fístulas e menor necessidade de retalhos e técnicas complexas para a correção da hipospádia no grupo em que houve administração hormonal pré-operatória.

Em recente estudo do nosso grupo de pesquisa, foi avaliado o uso da testosterona tópica em crianças com hipospádia e comparado com grupo placebo. Segundo seus resultados, o uso prévio de testosterona tópica (propionato de testosterona a 1%) em crianças com hipospádia, aplicados duas vezes ao dia por 30 dias antes da cirurgia, proporcionou significativo aumento da vascularização do prepúcio (neovascularização), o que poderia estar relacionado à melhor oxigenação das células relacionadas à cicatrização (BASTOS *et al.*, 2011). Foi demonstrado aumento significativo no número absoluto de vasos sanguíneos e também na densidade vascular do prepúcio no grupo que usou testosterona. Em outro estudo do mesmo autor (BASTOS, 2009), este concluiu que a testosterona está associada a uma menor homogeneidade e densidade de superfície de fibras colágenas, quando comparada ao grupo controle. Crianças tratadas

com testosterona também apresentaram menor densidade na distribuição de fibras elásticas que o grupo não tratado.

Essa hipótese já havia sido levantada anteriormente, correlacionando o aumento temporário na vascularização peniana proporcionado pela testosterona à melhora da cicatrização cirúrgica. Em estudo desenvolvido com enxerto de pele humana em ratos após uso de testosterona tópica, observou-se aumento significativo dos vasos sanguíneos, indicando que a testosterona seria capaz de promover angiogênese e reduzir o tecido fibroso nestes (STERN *et al.*, 2004).

Kaya *et al.* (2008) realizaram estudo randomizado em que a testosterona foi comparada ao placebo, e demonstraram que a testosterona tópica estaria associada à redução na incidência de complicações pós-operatórias, incluindo deiscência, estenose e fístula, ao promover aumento peniano. Vários outros estudos também ratificaram que a testosterona pré-operatória poderia ser benéfica em reduzir a incidência dessas complicações pós-operatórias (AHMAD *et al.*, 2011; ASGARI *et al.*, 2015).

2.3.2 CONTRA A TESTOSTERONA:

A segunda corrente argumenta que as vantagens relativas ao uso da testosterona antes da correção da hipospádia ainda não foram elucidadas de forma clara, inclusive associando a testosterona à repressão do reparo cutâneo (MANZONI *et al.*, 2004).

Gorduja *et al.* (2011) realizaram estudo de coorte não randomizado com 126 meninos e mostraram que a incidência de complicações relacionadas à má cicatrização foi maior no grupo que usou testosterona pré-operatória. É preciso ressaltar que o estudo apresenta críticas devido à sua heterogeneidade e ao fato de que o grupo testosterona apresentava maior número de casos complexos, o que por si só já aumentaria a chance de complicações.

Entretanto, este mesmo achado também foi confirmado em revisão sistemática: Wright *et al.* (2013) demonstraram piora no processo de cicatrização e maior risco de complicações pós-operatórias em pacientes com hipospádia grave que usaram testosterona antes do procedimento cirúrgico.

Menon *et al.* (2017) conduziram estudo prospectivo randomizado para avaliar a incidência de fístula uretrocutânea e deiscência da ferida operatória em pacientes com hipospádia submetidos a uretroplastia. Embora a incidência de fístula tenha sido semelhante ao grupo controle, a incidência de deiscência da ferida foi significativamente maior no grupo tratado com testosterona, além disso, este mesmo grupo apresentava maior infiltrado linfocitário na avaliação histológica e maior edema e inflamação no pós-operatório.

É importante destacar que já é bem descrita a associação da testosterona com o pior reparo tecidual em outras áreas do corpo. Gilliver e colaboradores (GILLIVER *et al.*, 2003; GILLIVER *et al.*, 2006; GILLIVER e ASHCROFT, 2007; GILLIVER *et al.*, 2007; GORDUZA *et al.*, 2011) demonstraram, por vários estudos, que androgênios são repressores do reparo cutâneo, retardando a cicatrização e aumentando a inflamação. Os androgênios são prejudiciais também no que se refere à uretra prostática: recente estudo demonstrou que os mesmos regulam a resposta inflamatória durante a cicatrização, sendo comprovado que a privação androgênica acelera a cicatrização (WANG *et al.*, 2017).

A testosterona tópica também poderia estar associada à maior incidência de eventos adversos locais do que a parenteral, (NETTO *et al.*, 2013) como hiperpigmentação e irritação cutânea ou aumento da pilificação na região genital. Outros eventos adversos reportados seriam comportamento agressivo e aumento da frequência de ereções nos meninos em uso de testosterona, embora sejam efeitos transitórios (WONG e BRAGA, 2015).

Recente estudo retrospectivo (RYNJA *et al.*, 2018) que avaliou 121 adultos submetidos a correção da hipospádia na infância demonstrou que não houve diferença quanto às taxas de complicação nem quanto à percepção estética peniana quando comparado o uso da testosterona pré-operatória e o placebo. Dessa forma, o real benefício da testosterona na prevenção das complicações devido ao aumento peniano necessita de maiores comprovações a fim de justificar seu uso, mesmo sabendo de seu efeito deletério no reparo tecidual.

2.3.3 O ESTRADIOL TÓPICO NO PRÉ-OPERATÓRIO

Na menopausa ocorre diminuição progressiva da produção estrogênica, levando à diminuição da espessura da pele e da produção de colágeno, o que torna mais evidente o envelhecimento cutâneo. Já foi comprovado que esses efeitos podem ser revertidos com a aplicação tópica de estradiol. Son e colaboradores (2005) estudaram a pele de pacientes após a menopausa e demonstraram que a aplicação tópica de estradiol aumentou a quantidade de colágeno e a proliferação de ceratinócitos, aumentando a espessura da epiderme

Sauerbronn *et al.* (2000), por sua vez, demonstraram aumento de 6,49% no volume de fibras colágenas sem aumento da espessura da epiderme, após aplicação de estradiol tópico, a partir da análise computadorizada de biópsias de pele. Em outro estudo, foi encontrado aumento significativo da espessura da pele (e não da epiderme isoladamente) sob o trocânter, medido através de ultrassom e biópsia do local (MAHEUX *et al.*, 1994). Brincat *et al.* (1985) também demonstraram aumento do colágeno na pele não lesionada.

Entretanto, o estradiol tópico ainda não tem sua aplicabilidade bem estudada para o pré-operatório nos casos de hipospádia. O único trabalho publicado sobre a administração de estradiol tópico nesse grupo de pacientes é aquele desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, conduzido por Paiva *et al.* (2016). Neste trabalho, os autores concluíram que o estradiol tópico não foi associado a efeitos adversos persistentes e não proporcionou mudanças na biometria peniana.

Sabe-se que eles modulam a reação inflamatória, aceleram a reepitelização, estimulam a angiogênese e a contração da ferida (ASHCROFT *et al.*, 2003). O estudo de seus efeitos no tecido prepucial de pacientes com hipospádia é ainda inédito, porém, suas propriedades cicatrizantes, já descritas em outras partes do corpo, poderiam ser benéficas neste grupo de pacientes, visto que várias complicações pós-operatórias decorrem justamente da deficiência no reparo cutâneo.

2.4 A IMPORTÂNCIA DO PREPÚCIO NA TÉCNICA OPERATÓRIA

Para que se obtenha aspecto funcional e estético normais após a cirurgia, é importante que ocorra boa cicatrização, não só da neouretra, mas também de todos os retalhos e eventuais enxertos utilizados. Segundo Joseph e Perez (1999) , o uso de um tecido bem vascularizado para recobrir a neouretra é o fator individual mais importante na prevenção de fístulas.

A conduta cirúrgica na hipospádia visa à correção funcional e estética da genitália masculina. O prepúcio exuberante que cobre a face dorsal da glândula deve ser corrigido para compensar sua deficiência na porção ventral. A pele prepucial e peniana constitui o tecido empregado na grande maioria das técnicas de correção de hipospádia, utilizando principalmente o excedente cutâneo da face dorsal do prepúcio, que já seria naturalmente removido por questões estéticas. (SPINOIT *et al.*, 2013)

Em 1977, Devine e Horton publicaram técnica para uretroplastia com confecção de enxerto de pele da extremidade prepucial distal. Este então é tubulizado para constituir o segmento da neouretra distal. Em 2017, os mesmos autores reiteraram sua preferência pelo enxerto de pele prepucial, afirmando ser possível a correção em um tempo cirúrgico, com baixa incidência de fístulas no pós-operatório, e declarando que a pele prepucial seria mais adequada para uso como enxerto nos casos de hipospádia.

Como o enxerto de pele total do prepúcio apresenta menor grau de contração secundária que o enxerto de pele parcial, McCormack (1954) defendeu o uso do primeiro para a reconstrução da uretra. Porém, devido à nutrição deficiente do enxerto, quando comparada ao retalho, passou-se então a estudar os transplantes pediculados de pele prepucial e peniana baseados nos conceitos descritos inicialmente por Asopa e colaboradores (1971).

Importante contribuição foi dada por Duckett (1980) ao descrever a irrigação arterial longitudinal da pele prepucial dorsal, que permite ser facilmente separada do tecido subcutâneo da pele peniana. Desta forma, é possível obter retalhos em ilha do prepúcio, que podem ser utilizados para substituir a uretra na hipospádia.

O exposto acima reafirma a importância de ter um prepúcio saudável e de boa qualidade tecidual para o sucesso final da correção da hipospádia, assim como a importância de estudos que busquem formas de melhorar as condições deste tecido.

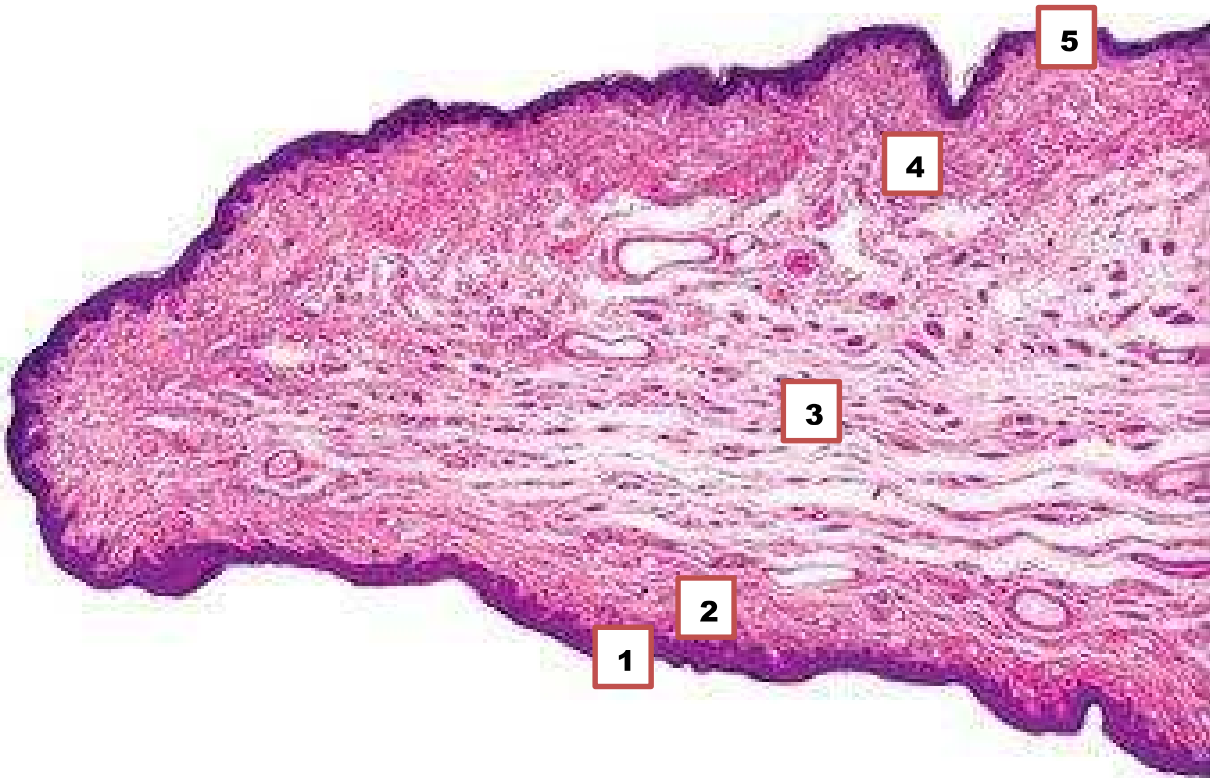
2.5 HISTOLOGIA DO PREPÚCIO

O prepúcio é uma membrana dupla que envolve a glândula, e como explicitado anteriormente, é frequentemente utilizado como enxerto ou retalho para a reconstrução cirúrgica nos casos de hipospádia.

A nível microscópico, é constituído por um eixo fibromuscular revestido internamente por membrana mucosa e externamente por pele. Histologicamente identifica-se cinco componentes, explicitados em sequência na Figura 1:

Figura 1: Fotomicrografia ilustrativa dos cinco componentes histológicos do prepúcio, identificados por números:

- 1) Tecido epitelial pavimentoso estratificado não ceratinizado da mucosa, similar e em continuidade com àquele da glândula;
- 2) Tecido conjuntivo propriamente dito do córium ou lâmina própria
- 3) Eixo central de tecido muscular liso e tecido conjuntivo frouxo, constituindo a lâmina Dartos
- 4) Tecido conjuntivo propriamente dito da derme, constituída por fibras colágenas e elásticas
- 5) Tecido epitelial pavimentoso estratificado ceratinizado, a epiderme, que contém ceratinócitos e melanócitos, espessura média variável, aproximada de $20.54 \pm 12.51\mu\text{m}$ desde sua camada basal até o estrato córneo (DINH et al., 2010)



Fonte: Elaborado pela autora

A pele do prepúcio apresenta características típicas de uma pele fina inespecífica, porém com algumas particularidades: a camada epidérmica é muito fina com queratinização escassa. É nítida a abundância de fibroblastos ativos. A derme papilar é rica em nervos e linfócitos. Uma rede capilar densa pode ser observada tanto na extremidade superior quanto inferior da derme. Não há zona densa de colágeno. Melanócitos podem ser observados, porém são escassos. Fibras elásticas são abundantes e densas. A derme reticular apresenta aspecto frouxo entre as fibras de colágeno, que são orientadas tanto no sentido longitudinal quanto horizontal. (TUNCALI *et al.*, 2005)

A separação entre prepúcio e glânde inicia-se em torno do sexto mês de gestação e envolve a ceratinização do prepúcio e do epitélio da glânde. A ceratinização inicia-se em lados opostos, na coroa da glânde e na margem distal do prepúcio, a qual se estende para ambos os lados. Esse processo leva à formação do espaço prepucial, separando a pele da glânde.

A utilização do prepúcio como enxerto de pele total, de forma geral, é bastante difundida e aceita na literatura devido às suas inúmeras vantagens, como fácil manipulação, baixa incidência de contração secundária, além de ser constituído de tecido altamente elástico, flexível, que permite a inosculação na área receptora sem maiores dificuldades. É descrito seu uso para casos de sindactílias, queimaduras, reconstrução de conjuntiva e traumas de mão (TUNCALI *et al.*, 2005).

A cicatrização dos tecidos no pós-operatório envolve três fases: inflamatória, proliferativa e maturação. A falha ou prolongamento de uma destas fases pode causar um retardo ou não oclusão da ferida. O colágeno tipo I é aquele predominante na pele. O colágeno tipo III é distribuído juntamente com o tipo I, porém essas proporções se alteram durante o reparo tecidual. O colágeno tipo III é o primeiro a se depositar na cicatrização, ainda na fase proliferativa, causando o aumento de sua proporção, e na fase de maturação o colágeno tipo III é substituído pelo tipo I. Assim, a maior deposição do colágeno tipo I ocorre principalmente na fase de maturação da cicatrização. (HAYASHI *et al.*, 2011)

Devido a essa dinâmica no processo de cicatrização, o colágeno tipo III é considerado imaturo ou jovem, e o colágeno tipo I é considerado maduro ou tardio.

A resistência mecânica da pele prepucial está estreitamente relacionada à presença das fibras de colágeno na derme reticular. A quantificação destas fibras permite avaliar o efeito do tratamento hormonal empregado em relação à reparação tecidual.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais:

- Avaliar os efeitos teciduais do uso de hormônios tópicos no pré-operatório da correção da hipospádia que possam estar envolvidos no reparo ao nível da epiderme e derme prepucial, comparando-os entre os grupos: Testosterona, Estradiol e Controle

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar e comparar, em estudo histológico e morfométrico, a espessura da epiderme do prepúcio em cada grupo estudado
- Avaliar e comparar, em estudo histoquímico, a expressão de colágeno tipo I e tipo III no prepúcio de cada grupo estudado

4 PACIENTES E MÉTODOS

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (Parecer: 983.247 / CAAE: 33295514.4.0000.5147 – Anexo 1), segundo as normas da declaração de Helsinki. Os responsáveis pelas crianças concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (Apêndice 1)

As crianças foram atendidas no ambulatório de Urologia Pediátrica do Hospital Universitário – Centro de Atenção à Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-CAS), sem qualquer ônus para a instituição ou prejuízos ao paciente. Elas foram operadas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU-UFJF) e no Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (HMTJ-SUPREMA).

A seleção das crianças para os grupos de estudo foi feita de forma aleatória, utilizando programa de computador *Research Randomizer Form v4.0* (<http://www.randomizer.org/form.htm>), após primeira consulta ambulatorial, quando foi feita indicação operatória. A classificação da hipospádia foi avaliada pelo médico assistente, de acordo com a localização do meato uretral.

As formulações tópicas foram manipuladas na farmácia da UFJF, com validade de três meses, conservadas em temperatura ambiente e disponibilizadas sem qualquer custo ao paciente. Os pacientes foram divididos em 3 grupos:

Grupo Testosterona (GT): crianças que fizeram uso de creme de propionato de testosterona a 1%;

Grupo Estradiol (GE): crianças que fizeram uso de creme de estradiol a 0,01%;

Grupo Controle (GC): crianças que fizeram uso do creme hidratante (placebo).

O creme de testosterona e estradiol continham, além dos hormônios nas concentrações já citadas, os seguintes excipientes: petrolato líquido, metilparabeno, propilparabeno, cera emulsificante aniônica, butil-hidroxianisol, ácido cítrico e água.

O creme hidratante formulado foi composto apenas por substâncias de caráter neutro (estabilizantes e conservantes) na seguinte composição: estearato de octila, BHT, sorbitol, nipagim, nipazol, EDTA, propilenoglicol, emulgade, akzonobel e água.

Os pais ou responsáveis foram orientados a administrar as formulações em dose quantificada em uma colher de café rasa de aproximadamente 5 gramas em toda a superfície peniana, inclusive na glândula, 2 vezes ao dia, por 30 dias, interrompendo o uso 1 a 10 dias antes do procedimento cirúrgico.

Meninos elegíveis ao estudo:

- Pré-púberes, com idade de 6 meses a 9 anos, 11 meses e 29 dias de vida
- Ausência de outras anomalias penianas ou genitais associadas;
- Ausência de tratamento prévio para hipospádia ou outra operação peniana;
- Sem história de uso prévio de androgênio ou qualquer medicação que pudesse interferir no eixo hipotálamo-hipófise-testículo;
- Ausência de distúrbios endocrinológicos.

Meninos não incluídos ou excluídos do estudo:

- Com 10 anos ou mais de vida;
- Meninos com sinais clínicos de puberdade, mesmo com idade inferior a 10 anos
- Com hipospádias glandares;
- Com outras anomalias genitais ou penianas;
- Com história de operação peniana prévia;
- Que fizeram uso de androgênio em algum momento da vida.
- Portadores de endocrinopatias;
- Em uso de medicações que possam afetar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo.
- Uso incorreto do hormônio prescrito ou perda de seguimento, ou que não seguiram o protocolo corretamente;

Após os 30 dias em uso dos hormônios, a administração tópica foi suspensa e as crianças aguardaram de um a dez dias para serem submetidas ao procedimento cirúrgico. Dois cirurgiões foram responsáveis pela correção de todos os casos de hipospádia incluídos, sendo realizados no Hospital e Maternidade Terezinha de Jesus ou no Hospital Universitário (Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF).

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de prepúcio utilizadas para análise histológica e morfométrica foram excisadas durante o procedimento cirúrgico. A extirpação do prepúcio já é realizada de forma rotineira durante a operação, sendo este habitualmente desprezado. O aproveitamento destas peças cirúrgicas como objeto de investigação de várias naturezas, além de não causar qualquer prejuízo funcional ou estético ao paciente, constitui mérito em pesquisa clínica por se tratar de utilização de material nobre (humano).

O armazenamento do material ficou sob responsabilidade dos pesquisadores, sendo estocados em caixas apropriadas, em temperatura ambiente, até o momento da análise macroscópica. Foi realizada secção do prepúcio ressecado em dois segmentos, de forma que separasse a região interna, revestida por mucosa, da região externa revestida por pele, e os fragmentos foram distendidos em superfície rígida de isopor e fixados em formol tamponado a 10%. (Figura 2)

Figura 2: Fragmento de prepúcio fixado em superfície rígida



Fonte: Elaborado pela autora

No laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia - ICB da UFJF, os prepúcios foram clivados (Figura 3) de forma que o corte fosse perpendicular à superfície epidérmica da amostra, os fragmentos selecionados foram submetidos à técnica histológica convencional para preparo do material antes da coloração (processados, desidratados, diafanizados, impregnados e incluídos em bloco de parafina).

Figura 3: Fragmento de prepúcio clivado e dimensionado



Fonte: Elaborado pela autora

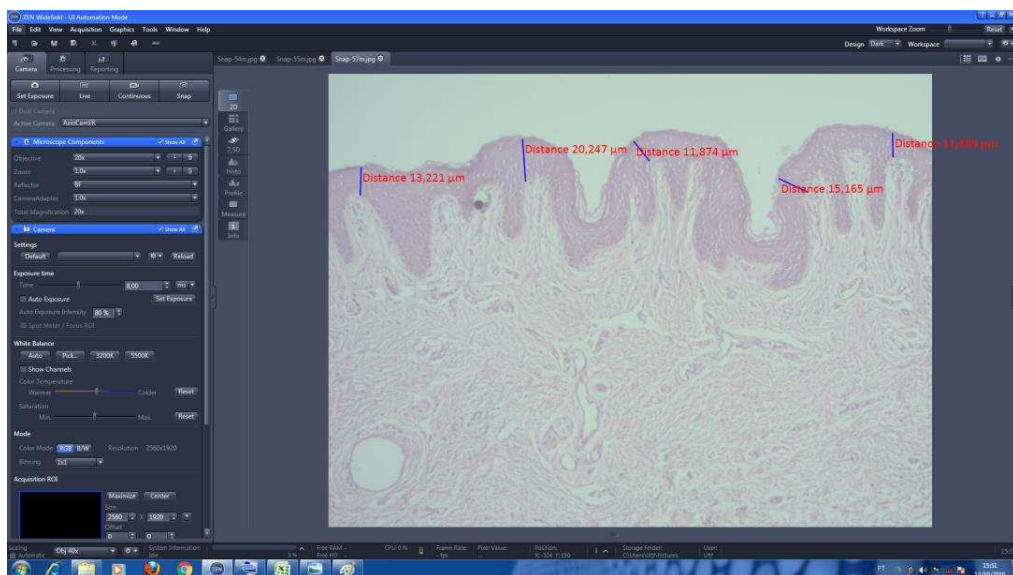
Em seguida, os blocos foram submetidos a cortes de 4 μ m de espessura e distendidos em lâminas convencionais. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol em estufa a 60°C e reidratados com álcool em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histológica e morfométrica e outros cortes foram corados com picrossirius para avaliação histoquímica.

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a coloração de HE, as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina por 55 segundos, seguido por 10 segundos em água corrente e mais 5 segundos em eosina. As lâminas coradas com HE foram submetidas à análise morfométrica da epiderme. Para a análise, foi usado microscópio óptico modelo Olympus U-TV0.5XC-3, acoplado ao programa eletrônico Zeiss, disponível no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFJF.

A medida da espessura do epitélio ceratinizado (epiderme) foi realizada em toda a extensão da lâmina, na lente de 20x de aumento, por meio de 5 medidas perpendiculares, (Figura 4) partindo do estrato basal até a parte mais externa da camada granulosa, ou seja, sem incluir a camada córnea. Esta não foi incluída na medida pela frequente presença de áreas de descamação do estrato córneo, o que poderia resultar em medida sub ou superestimada, prejudicando a confiabilidade do resultado.

Figura 4: Demonstração do software para medida da epiderme, com os 5 traçados dispostos em cada campo, que indicam medidas da espessura da epiderme, em microscopia óptica com 20 x de aumento.



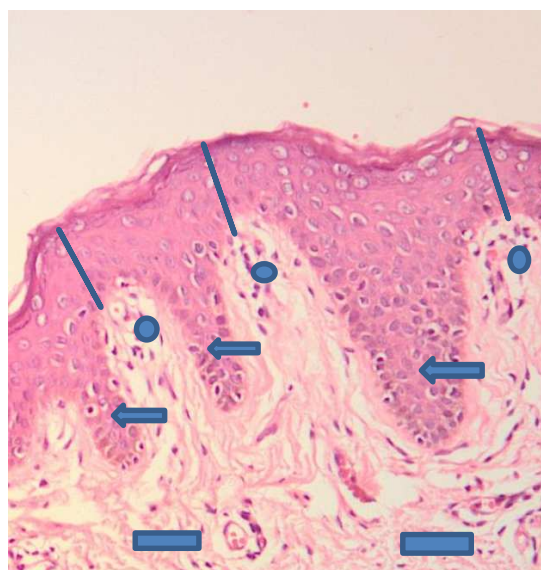
Fonte: Programa eletrônico Zeiss, fotomicrografia elaborada pela autora

A partir de cada lâmina foram extraídas aproximadamente 10 fotos, de forma a abranger toda a extensão de sua epiderme, a fim de atingir maior precisão na medida de sua espessura. Dessa forma, chegamos a um total aproximado de 50 a 60 medidas para cada lâmina, ou seja, para cada prepúcio estudado.

O fato de a interface dermoepidérmica apresentar sinuosidades faz com que a camada basal epidérmica não seja retilínea em toda a sua extensão. Assim, os traçados para medida da epiderme foram posicionados acompanhando esta sinuosidade, e não necessariamente paralelos entre si.

Além disso, os 5 traçados foram dispostos de forma que fossem aproximadamente equidistantes entre si, e a imagem dividida em 6 partes aproximadamente simétricas. Evitou-se fazer a medida em áreas de cristas epidérmicas, pois algumas amostras apresentavam epiderme fina e cristas profundas, ou seja, a profundidade destas últimas poderia superestimar a medida final da epiderme. Nesses casos, as linhas foram posicionadas em área imediatamente adjacente à crista epidérmica, estendendo-se do estrato basal supra papilar até a granulosa. (Figura 5) A partir deste método foi determinada a Média da Espessura da Epiderme (MEE).

Figura 5: Fotomicrografia esquemática da análise tecidual do prepúcio, onde se identifica a epiderme supra-papilar (linhas), papilas dérmicas (círculos), cristas epidérmicas (setas) e derme reticular (retângulos). HE, 200X.



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

Para a análise do colágeno dérmico, cortes histológicos adicionais foram submetidos à técnica histoquímica picrossirius, método já padronizado no Laboratório de Histologia da UFJF. As lâminas foram coradas com a solução A por 5 minutos, seguido por 1 hora com a solução B e lavadas por 10 minutos na solução C. Após esse processo, foram desidratadas e montadas (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das soluções A, B e C, que foram utilizadas em sequência para confecção das lâminas de picrossirius.

Solução A	5 g de Hematoxilina cristalizada, 50 ml de álcool absoluto, 100 g de alúmen de potássio, 100 ml de água destilada, 2,5 g de óxido de mercúrio
Solução B	0,2 g de Sírius Red, 100 ml de ácido pícrico saturado
Solução C	55 gotas de HCl 1N, 100 ml de água destilada

Fonte: Laboratório de Histologia da UFJF

As lâminas coradas por picrossirius foram examinadas sob luz polarizada, sendo que a área constituída por colágeno apresenta aspecto birrefringente. Imagens com aproximadamente 2560 x 1920 pixels representativas de cada lâmina foram capturadas utilizando-se o programa eletrônico *Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics TM* acoplado a um microscópio óptico Olympus BX51. Dois examinadores avaliaram as imagens e identificaram as fibras de colágeno presentes na derme das amostras, sendo determinado o volume dessas fibras por área de campo analisada.

Esta técnica permite visualizar e distinguir as fibras colágenas do tipo I (colágeno maduro) e do tipo III (colágeno jovem) em decorrência da birrefringência dessas fibras com cores distintas, ou seja, vermelho e verde para os tipos I e III, respectivamente,

enquanto que os demais componentes (material amorfo) do tecido são visualizados como fundo em cor preta. Este método é, portanto, específico para a diferenciação dos colágenos tipos I e III.

As amostras foram analisadas em microscopia óptica de luz polarizada modelo IPWin32 por dois examinadores habilitados no Laboratório de Farmácia e Bioquímica da UFMG e no Laboratório de Genética da UFJF. Foram obtidas fotos de toda a extensão da derme presente nas lâminas, usando lentes de 20 x de aumento, e em seguida feita a quantificação do colágeno.

No *Image Pro-Plus* o processamento das imagens foi realizado com a ferramenta “*Count/Size*”, presente no menu “*Measure*”. Foi selecionado o atributo “área” e definidas duas classes para representar as fibras de colágeno dos tipos I e III. À medida que os pixels com tonalidade correspondente às fibras de colágeno do tipo I ou do tipo III são selecionados (“*red*” e “*green*”, respectivamente), todas as áreas da imagem com a mesma cor são contabilizadas, gerando estatísticas de média e desvio padrão. O resultado, portanto, foi expresso em número de pixels na cor vermelho e verde por imagem.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas, contínuas ou ordinais, foram descritas por medidas de tendência central (médias) e de dispersão (desvios-padrões). As variáveis qualitativas ou categóricas foram descritas por seus valores absolutos ou proporções. Na avaliação das diferenças entre os grupos utilizou-se o teste ANOVA, e o pós-teste de Dunnett para comparações entre os grupos. Na comparação dos dados categóricos utilizou-se o teste do qui-quadrado. Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Para as análises utilizou-se o programa estatístico computacional (*GraphPad Prism, versão 8.1.2, GraphPad Software, San Diego-CA, USA*).

5 RESULTADOS

Trinta e três crianças completaram o protocolo, das quais 13 foram incluídas no GT, 10 no GE e 10 no GC.

A distribuição entre os grupos de acordo com a classificação da hipospádia foi realizada de forma aleatória (Tabela 2):

Tabela 2: Distribuição dos tipos de hipospádia de acordo com sua localização anatômica em cada um dos grupos estudados (teste Qui-quadrado)

Grupos	Coronal n (%)	Subcoronal n (%)	Médio-peniana n (%)	Proximal n (%)	Total n (%)
GT	5(38%)	4(31%)	3(23%)	1(8%)	13(100%)
GE	4(40%)	5(50%)	1(10%)	0(0%)	10(100%)
GC	4(40%)	5(50%)	1(10%)	0(0%)	10(100%)
Total	13(39%)	14(42%)	5(15%)	1(3%)	33(100%)

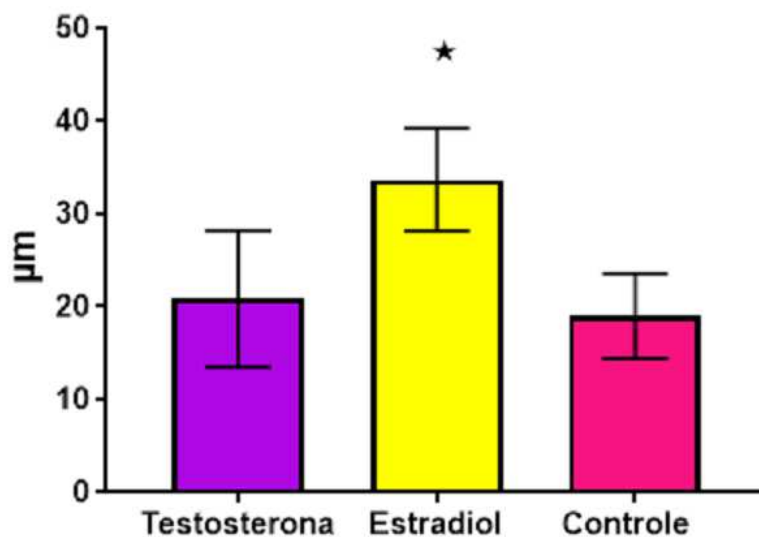
p=0,5921

A média de idade do total de 33 pacientes foi de $4,01 \pm 2,92$ anos, sendo que no GT foi de $3,15 \pm 2,64$ anos, no GE foi de $3,80 \pm 2,97$ anos e no GC foi de $5,10 \pm 3,17$ anos. Não houve diferença significativa quanto à distribuição entre os grupos ($p=0,293$).

5.1 ESPESSURA DA EPIDERME

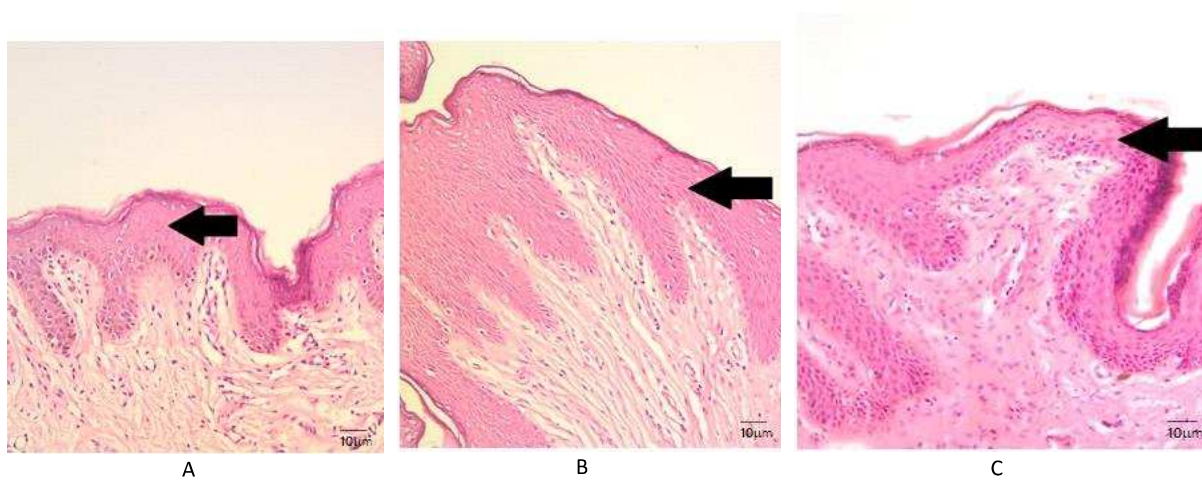
A medida da espessura da epiderme (MEE), avaliada pela coloração HE, diferiu entre os grupos, e foi significativamente maior no GE quando comparados ao GT e ao GC, respectivamente $33,67 \pm 5,53 \mu\text{m}$; $20,84 \pm 7,34 \mu\text{m}$, e $18,99 \pm 4,54 \mu\text{m}$, $p<0,0001$. Os dados estão demonstrados no Gráfico 1:

Gráfico 1: Valores da MEE do prepúcio de pacientes, medida em micrômetros, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6: Análise da espessura da epiderme (seta). A: Grupo Testosterona. B: Grupo Estradiol. C: Grupo Controle. HE 200X.

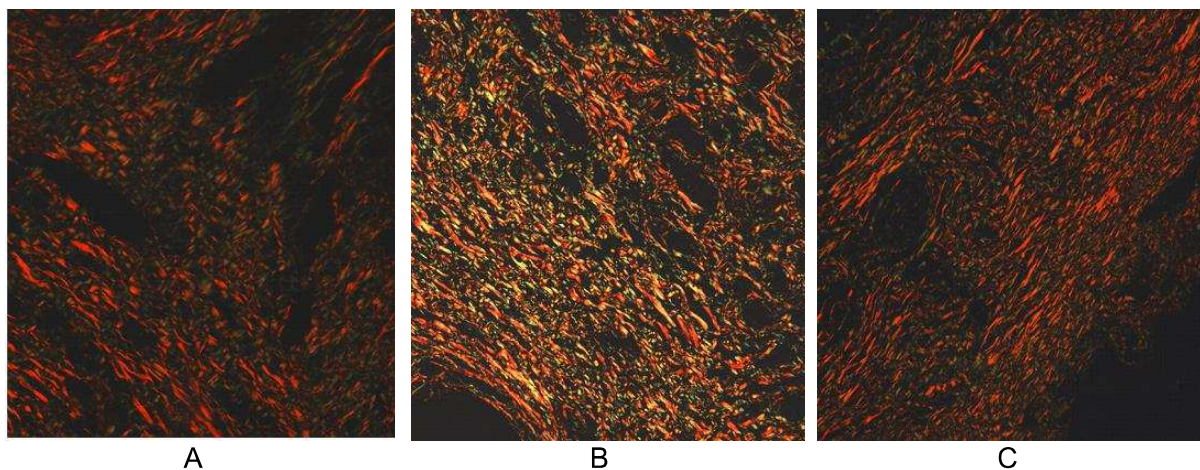


Fonte: Elaborado pela autora

5.2 EXPRESSÃO DO COLÁGENO

A expressão do colágeno no prepúcio dos pacientes pode ser ilustrada a partir da figura 7, em que o colágeno tipo I se cora de vermelho e o tipo III se cora de verde.

Figura 7: Intensidade de fibras colágenas tipo I e III. A: Grupo Testosterona. B: Grupo Estradiol. C: Grupo Controle. Picrossirius, polarização 200X.

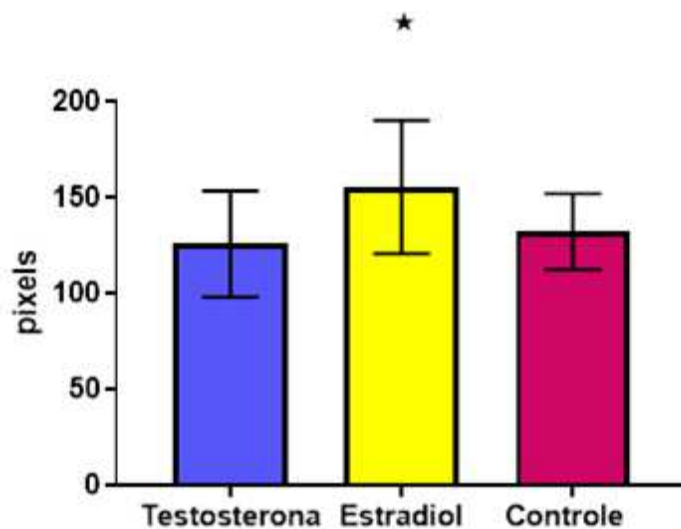


Fonte: Elaborado pela autora

A expressão do colágeno tipo I no GE foi maior que no GT e GC, conforme evidenciado no Gráfico 2.

A média de colágeno tipo I no GE foi de $155,6 \pm 34,85$ pixels. No GT foi de $125,8 \pm 27,72$ pixels e no GC os valores foram de $132,2 \pm 19,81$. $p=0,003$.

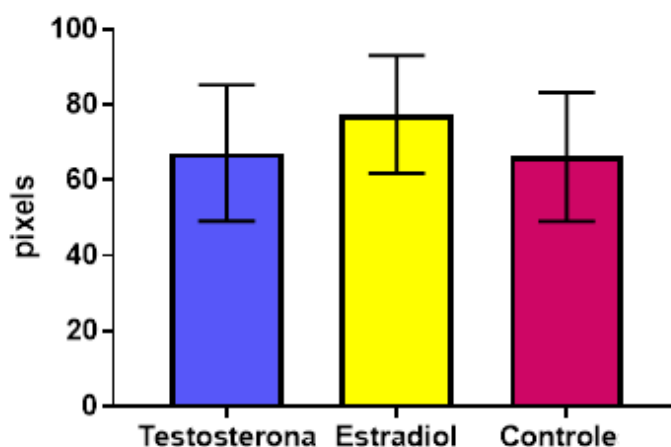
Gráfico 2: Expressão do colágeno tipo I no prepúcio de pacientes, medida em pixels, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).



Fonte: Elaborado pela autora

Já a expressão do colágeno tipo III (Gráfico 3) não apresentou diferença significativa entre os três grupos ($p=0,271$), sendo no GT de $67,18 \pm 18,08$, GE de $77,39 \pm 15,61$ pixels, e no GC de $66,17 \pm 17,12$ pixels.

Gráfico 3: Expressão do colágeno tipo III no prepúcio de pacientes, medida em pixels, nos grupos Testosterona, Estradiol e Controle (ANOVA).



Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

O aumento da espessura da epiderme e do colágeno dérmico associados ao uso tópico do estradiol já haviam sido demonstrados na pele de outros sítios anatômicos (MAHEUX *et al.*, 1994; ASHCROFT e ASHWORTH, 2003; SON *et al.*, 2005; GILLIVER e ASHCROFT, 2007), mas seu achado no prepúcio de pacientes com hipospádia é inédito. O uso tópico do estradiol como terapia hormonal no pré-operatório da correção da hipospádia já é, por si só, assunto pouco debatido, sendo desconhecidos os seus efeitos teciduais no prepúcio. Além disso, em nosso estudo ainda avaliamos os efeitos da administração tópica de testosterona, o que também é motivo de bastante debate no meio científico porque ainda não há consenso ou padronização quanto a seu uso.

Também não há definição sobre qual seria a melhor via de administração hormonal pré-operatória. (WONG e BRAGA, 2015) O tratamento hormonal tópico teria a vantagem de causar menos desconforto ao paciente do que o intramuscular, aliado ao fato de proporcionar maior praticidade e rapidez de aplicação. Em contrapartida, o uso da via tópica de aplicação é impreciso, pela dificuldade de mensurar a dose exata absorvida e nem controlar precisamente a aplicação. Dessa forma, o tratamento tópico pode ser considerado de difícil controle pelos pesquisadores, já que o volume exato e o horário das administrações ficariam sob responsabilidade daqueles próximos à criança.

Em nosso estudo, procuramos orientar pacientes e familiares de forma bem precisa quanto à dose a ser administrada a fim de evitar tal viés. Optamos pelo uso do propionato de testosterona a 1% para dar seguimento a estudos prévios já realizados por nosso grupo (BASTOS, 2009; BASTOS *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2016). O tempo de uso (30 dias) vai ao encontro de outros estudos que utilizaram a via tópica. (NETTO *et al.*, 2013)

A inclusão de um grupo controle com crianças saudáveis submetidas a circuncisão poderia ter sido questionada, entretanto, haveria muitas críticas devido a questões éticas. Além disso, questiona-se que o prepúcio de crianças com hipospádia apresente diferenças histoquímicas em relação ao prepúcio de crianças saudáveis (QIAO *et al.*, 2012), o que poderia se constituir em um viés de seleção.

Por definição, grupo controle é um grupo de sujeitos semelhantes ao grupo tratado em vários aspectos demográficos, porém não recebendo a medicação ou fator em estudo, servindo, portanto, como comparação quando o resultado do tratamento for avaliado. Dessa forma, acreditamos que o melhor grupo controle seria constituído por crianças, que também apresentassem hipospádia (semelhanças demográficas), mas que fossem tratados com creme neutro (nem estradiol nem testosterona).

A medida em colher rasa de café foi uma forma de facilitar a dosagem e padronizar quantidade similar de creme para todos os pacientes, visto ser um instrumento de medida encontrado em todos os lares brasileiros. O fato de a medicação tópica ser mais cômoda para a criança tanto do ponto de vista físico quanto psicológico facilitou a adesão ao tratamento tanto pela criança quanto pelos responsáveis pela administração (FOWLER-KERRY e LANDER, 1987). Além disso, a opção pela via intramuscular impediria, do ponto de vista ético, a inclusão de um grupo controle, uma vez que não seria possível fazer injeção de placebo. Como todos os grupos receberam a medicação da mesma forma, ou seja, tópica, considera-se que qualquer problema na aplicação possa ter ocorrido em qualquer grupo.

Embora a testosterona seja amplamente utilizada, mesmo sem evidências concretas quanto à melhor forma de administração, o estradiol tópico ainda é terapia desconhecida pela maioria dos urologistas pediátricos. Muitos autores advogam pelos benefícios da testosterona no aumento peniano, enquanto o estradiol não está associado a mudanças em sua biometria (PAIVA *et al.*, 2016). Por outro lado, são evidenciados os malefícios da testosterona no processo de cicatrização da pele, enquanto o estradiol chama atenção por seus benefícios no reparo tecidual em outros sítios anatômicos (GILLIVER e ASHCROFT, 2007).

O conceito de que a testosterona previamente à cirurgia poderia reduzir a incidência de complicações pós-operatórias pelo fato de proporcionar o aumento peniano e facilitar a técnica cirúrgica também é bastante debatido: (CHALAPATHI *et al.*, 2003; NETTO *et al.*, 2013; WONG e BRAGA, 2015; RYNJA *et al.*, 2018) alguns autores defendem que o crescimento peniano seria responsável por uma menor tensão nas bordas da ferida, dessa forma, proporcionando menor incidência de complicações relacionadas à cicatrização, inclusive fístula e estenose.

Asgari e colaboradores (2015) correlacionaram o uso da testosterona ao aumento peniano e também à menor incidência de complicações pós-operatórias. Entretanto, deve-se ressaltar que foi administrada testosterona via parenteral, o que poderia ocasionar níveis mais elevados na corrente sanguínea e mais efeitos colaterais. Outros autores estudaram a di-hidrotestosterona tópica, e defenderam que ela poderia reduzir complicações cirúrgicas e melhorar o resultado cosmético após o reparo da hipospádia (ROTH *et al.*, 2008). Entretanto, tais achados foram relacionados à di-hidrotestosterona, e não ao propionato de testosterona, como os nossos casos.

Em outro estudo com 200 pacientes e uso de testosterona intramuscular (BABU e CHAKRAVARTHI, 2017), foi novamente demonstrado que o aumento do diâmetro peniano poderia estar relacionada à prevenção de complicações. Uma particularidade desse estudo foi a separação dos pacientes em uso de testosterona entre “respondedores”, com aumento do diâmetro da glândula em mais que 2 mm, e “não-respondedores”. A prevenção de complicações só foi evidenciada naqueles pacientes “respondedores” à testosterona, o que corrobora que o benefício relacionado à testosterona no pós-operatório apenas se dá para os casos em que há aumento peniano de fato (BABU e CHAKRAVARTHI, 2017).

Numa recente série de 94 crianças portadoras de hipospádia anterior, com uso de testosterona intramuscular 30 dias antes de serem submetidas à uretroplastia, estas apresentaram aumento significativo das dimensões penianas (comprimento, circunferência e largura da glândula), assim como aumento na proliferação vascular e infiltração linfocítica. Porém houve também aumento da reação inflamatória e edema, principalmente no grupo operado após 3 meses do uso hormonal, com mais deiscência da ferida quando comparado com o grupo operado após 1 mês. Esse resultado pode estar relacionado à rápida reabsorção das suturas, devido ao aumento do infiltrado linfocítico local (MENON *et al.*, 2017).

Assim, por mais que possa haver benefícios quanto ao aumento peniano, a testosterona também apresenta desvantagens em relação ao reparo tecidual: Bastos *et al.* (2009) demonstraram que a testosterona estaria associada à redução na densidade das fibras colágenas, o que também já havia sido demonstrado em estudo conduzido por Stern *et al.* (2004), que utilizaram histoquímica com tricrômio de Masson para avaliar a

disposição organizacional das fibras colágenas após terapia tópica com testosterona e constatou-se redução da deposição de colágeno, porém sem quantificá-las. Os autores, entretanto, acreditaram que a redução do colágeno associada à testosterona tópica seria capaz de reduzir a fibrose tecidual em peles enxertadas em ratos. Além de não proporcionar aumento do colágeno, outro argumento desfavorável ao estímulo com testosterona seria seu efeito angiogênico, o que poderia aumentar o risco de hemorragia durante o ato operatório. (BASTOS *et al.*, 2011)

Em nosso estudo, a testosterona não estimulou a expressão de colágeno, mas também não houve redução significativa deste quando comparada ao controle, assim como recente estudo de com 35 pacientes com hipospádia em uso de testosterona tópica ou placebo no pré-operatório, onde foi utilizada a histoquímica com picrossirius para avaliar o padrão de distribuição das fibras colágenas, e assim como nossos resultados, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos testosterona e placebo (BASTOS, 2009). Entretanto, tal estudo não comparou a testosterona ao estradiol, e a avaliação das fibras colágenas foi realizada através da densidade em cruzes, critério estabelecido pelo próprio avaliador, não tendo recorrido a programa de computador específico que permita análise mais objetiva, como foi realizado em nossos casos.

A testosterona, então, poderia retardar a cicatrização por vários mecanismos, ao contrário do estradiol, que sabidamente acelera a cicatrização (GILLIVER *et al.*, 2003; GILLIVER *et al.*, 2006; GILLIVER e ASHCROFT, 2007; GILLIVER *et al.*, 2007; GORDUZA *et al.*, 2011). Por mais que os efeitos da testosterona sobre o aumento peniano sejam bem estabelecidos na literatura, e tais efeitos possam se constituir em benefício para determinado grupo de crianças com hipospádia, a literatura atual demonstra também um provável efeito danoso da testosterona, como foi exposto anteriormente. O que se discute nesse estudo não é o abandono da testosterona tópica no pré-operatório desses casos já bem indicados, mas sim o reconhecimento de que seus prejuízos sobre a cicatrização podem e devem ser eficazmente combatidos, de modo a evitar complicações ainda prevalentes, como fístula e deiscência.

Ambas estão entre as complicações de maior incidência após a cirurgia de correção de hipospádia e são associadas à deficiência da cicatrização, ou seja, são consequências de um desequilíbrio na produção de colágeno. Spinoit *et al.* (2013)

relataram em seu trabalho uma incidência de reoperação de 46% devido à fístula. Dessa forma, seria muito interessante a prevenção dessas complicações mais incidentes, e estimular a produção de colágeno nesses pacientes seria um grande aliado no processo de reparação da ferida.

O colágeno é componente fundamental no processo de cicatrização. O suporte estrutural da derme depende intrinsecamente da composição de sua matriz extracelular, que é principalmente constituída por colágeno. A pele sã apresenta aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno tipo III, embora essa proporção possa variar de acordo com a região do corpo. O tecido de granulação, por sua vez, apresenta 30% a 40% de colágeno tipo III.

Sabe-se que os níveis de colágeno diminuem conforme aumentam os anos de vida. Entretanto, sabe-se também que a fibra colágena é considerada uma molécula que persiste por muito tempo, apresentando meia-vida de 15 anos. Grande parte do colágeno presente no nascimento persiste até a fase adulta na derme papilar, porém não na derme reticular, onde ele diminui progressivamente com a idade. Este fato pode ser uma falha de nosso estudo, visto que não foi contabilizado o colágeno separadamente em cada camada dérmica, e sim na derme em sua totalidade (MARCOS-GARCES *et al.*, 2014). Entretanto, não foi objetivo desta pesquisa comparar, qualificar e quantificar o colágeno da derme papilar e reticular separadamente, e sim o colágeno dérmico total.

Em contrapartida, Dumas *et al.* (1994) demonstraram que a redução expressiva de fibras colágenas tem início após a segunda década de vida. Assim, o grupo etário que constitui os pacientes deste estudo ainda não teria iniciado seu processo de declínio acentuado dos níveis de colágeno. Além disso, os três grupos apresentaram médias semelhantes de idade, o que significa que os grupos são comparáveis entre si quanto a esta variável.

Acreditamos que a maior expressão de colágeno esteja relativamente ligada à maior síntese e/ou menor degradação deste componente, estimulado diretamente pela administração do hormônio tópico. Embora tal relação de causa-efeito seja comprovada na literatura, a partir de outros sítios anatômicos, seus benefícios quanto à melhora da qualidade do reparo tecidual não podem ser estabelecidos baseando-se apenas em nosso trabalho, visto que não foi estudada a incidência das complicações correlacionadas

no período pós-operatório. Dessa forma, não foi avaliado o impacto do aumento do colágeno na cicatrização desses pacientes do estudo, sendo necessário novas pesquisas para fortalecer e ratificar tal associação.

Witte *et al.* (1997) demonstraram que o colágeno tipo I está associado a um aumento na força tênsil da ferida. O colágeno tipo III não estaria associado a tal benefício. As fibras de colágeno tipo I, portanto, constituem uma família de proteínas da matriz que exercem papel fundamental na cicatrização, ao promover adesão para as células e consequentemente maior força para a pele.

Em nosso estudo, GE apresentou aumento da deposição de colágeno tipo I em relação ao GT e GC, o que seria, então, provavelmente benéfico para o pós-operatório dos pacientes. Através da análise de nossos resultados, acreditamos que o colágeno tipo III também poderia apresentar aumento significativo no GE se o estudo abrangesse um número maior de casos. Além disso, a produção de colágeno tipo III é estimulada pelo dano tecidual seguido da cicatrização, evento que não reproduzimos em nossos pacientes por questões éticas. De qualquer forma, o aumento do colágeno tipo I, por si só, já é capaz de sinalizar para uma provável melhora na resposta da pele ao dano tecidual caso o estímulo com estradiol tópico aconteça antes de um trauma cirúrgico.

A logística para análise dessas fibras colágenas nos proporcionou alguns obstáculos durante a pesquisa. A coloração com o picrossirius, embora seja uma das melhores formas de estudar o colágeno, ainda é método pouco disponibilizado e realizado por poucos profissionais nos centros de pesquisa e laboratórios da nossa cidade. Assim, para o emprego preciso do método de análise histoquímica, foi necessário aprender todos os seus detalhamentos no laboratório da UFMG.

Embora o estudo do colágeno e da espessura da epiderme após estradiol sejam inéditos no prepúcio de pacientes com hipospádia, estes já são bem debatidos quando se trata da pele de mulheres após a menopausa. Inclusive, diversos estudos já estabeleceram associação benéfica entre o estradiol tópico e o aumento da epiderme e do colágeno nessas pacientes (SON *et al.*, 2005; MARCOS-GARCES *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2016).

Castelo – Branco (1992) estudou a pele de 118 mulheres na pós-menopausa durante 12 meses, e demonstrou aumento dos níveis de colágeno em todas do grupo

estradiol, comparado a um decréscimo dos níveis no grupo placebo. Maheux (1994), por sua vez, demonstrou aumento de 33% na espessura da derme devido à maior produção de colágeno associada ao estradiol.

Já é bem estabelecido que a pele do prepúcio possui receptores para o estradiol, o que significa que é responsivo ao mesmo (JESMIN *et al.*, 2002). Sabe-se que existem os receptores para estradiol ER α e ER β , sendo este último predominante na epiderme (DINH *et al.*, 2010). Estudos variados também já demonstraram presença de receptores de estradiol na uretra, glândula, corpo cavernoso, prepúcio e placa uretral de crianças portadoras de hipospádia.(JESMIN *et al.*, 2002; CELAYIR *et al.*, 2007) Qiao *et al.* (2012) já haviam demonstrado a presença destes receptores estrogênicos alfa e beta no tecido prepucial, e afirmaram que os mesmos são fracamente expressos no prepúcio dos meninos com hipospádia, evidenciando o importante papel do estradiol no desenvolvimento normal do prepúcio humano.

Em nosso estudo foi possível evidenciar a relação de causa-efeito entre a administração tópica de estradiol e o aumento da epiderme e colágeno no sítio anatômico que sofreu a intervenção. Tal achado corrobora que o tecido prepucial do pênis com hipospádia também é responsivo ao estímulo com estradiol, o que indiretamente sinaliza para a presença e responsividade dos receptores de estradiol no prepúcio.

O estradiol tem efeito benéfico também quando se trata da pele lesionada, melhorando a cicatrização das feridas existentes (SHIMIZU, 2005; ZHOU *et al.*, 2016). Estudos recentes têm demonstrado que ele é capaz de acelerar o fechamento cutâneo através de vários mecanismos, dentre os quais podemos citar a proliferação e migração de ceratinócitos: o estradiol teria, então, um potente efeito mitogênico sobre ceratinócitos e também sobre fibroblastos, demonstrados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WILKINSON e HARDMAN, 2017).

Dessa forma, o aumento da espessura da epiderme poderia constituir em um efeito indireto do estradiol sobre os ceratinócitos. Já o aumento da expressão de colágeno seria um efeito indireto do estradiol sobre a atividade dos fibroblastos. (ZHOU *et al.*, 2016)

O estradiol também modula citocinas que influenciam a produção de componentes da matriz, contração da ferida e angiogênese (ASHCROFT *et al.*, 1999; ASHCROFT e ASHWORTH, 2003). Sabe-se que o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF)

é regulado pelo estradiol durante a cicatrização, ao estimular a proliferação da epiderme e a produção de células inflamatórias (ASHCROFT *et al.*, 2003). Verdier – Sevrain (2004) demonstraram que o estradiol poderia atuar sobre seus receptores, localizados nos ceratinócitos do prepúcio, estimulando a proliferação destas células. Os autores defendem que durante a cicatrização, o estrógeno seria capaz de estimular a multiplicação dos ceratinócitos com o objetivo de facilitar a reepitelização.

Gilliver *et al.* (2007), por sua vez, estudaram os efeitos do estradiol e de androgênios na cicatrização de feridas, e demonstraram que o estradiol limita a magnitude da resposta inflamatória. Os androgênios, ao contrário, dificultam o reparo tecidual da pele lesionada e aumentam a resposta inflamatória (MENON *et al.*, 2017).

Como este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos histológicos do estradiol tópico no prepúcio de pacientes com hipospádia, não há literatura disponível sobre o tema para compararmos nossos resultados. Até o momento da conclusão desse estudo encontramos apenas dois estudos publicados a respeito do uso do estradiol tópico no prepúcio humano.

No primeiro estudo, foram estudadas as repercussões clínicas do uso do estradiol tópico em pacientes com hipospádia, porém não foi realizada análise histológica dos mesmos. Paiva *et al.* (2016) estudaram 69 crianças após terapia tópica com estradiol, testosterona e placebo, e concluíram que a testosterona aumenta o diâmetro peniano, da glândula, e o tamanho do pênis. De acordo com os autores, diferente da testosterona, o estrogênio não provoca alterações na biometria peniana, não causando aumento significativo do tamanho do pênis, o que poderia ser uma desvantagem no sentido de não facilitar a técnica cirúrgica, especialmente naqueles casos de micropênis. Além disso, nesse estudo não foi observado alterações nos níveis séricos dos hormônios sexuais (testosterona livre e total, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e estradiol).

No segundo estudo, foram estudadas alterações histológicas do prepúcio de seis pacientes adultos e saudáveis que realizaram terapia tópica com estradiol antes da circuncisão, e foi comprovada a cornificação da mucosa escamosa. Este estudo teve o objetivo de avaliar uma possível proteção do epitélio do prepúcio ao contágio pelo HIV. O mesmo diferencia-se de nosso trabalho por estudar pacientes adultos e sem hipospádia, além de

ter estudado a porção interna do prepúcio, e não a externa.(PASK *et al.*, 2008)

Poucos estudos avaliaram a medida da espessura da epiderme do prepúcio, sendo em grande parte relacionados a essa suposta proteção que a maior espessura do epitélio local ofereceria contra o contágio do HIV. (DINH *et al.*, 2010)

No estudo de Dinh e colaboradores (2010) em 16 homens adultos, foi demonstrado que a espessura média do epitélio externo (epiderme) seria de $20,54 \pm 12,51 \mu\text{m}$, já a medida do epitélio da mucosa seria de $25,37 \pm 12,51 \mu\text{m}$. O mesmo autor enfatiza a dificuldade em identificar área correspondente ao epitélio da mucosa (“inner foreskin”) em todas as amostras de prepúcio. A MEE encontrada nos grupos GC e GT de nosso trabalho vão ao encontro dos dados fornecidos por Dinh. O GE de nosso trabalho, por sua vez, apresentou MEE bem superior à média disponível na literatura. Tal achado corrobora o fato de que há uma relação direta entre a espessura da epiderme encontrada no GE e o estradiol tópico administrado nesses pacientes. Entretanto, devemos ressaltar que há uma grande diferença na faixa etária dos pacientes avaliados em relação ao nosso estudo, além do fato de que o estudo de Dinh não envolveu pacientes com hipospádia nem houve estímulo hormonal pré-operatório.

A medida da epiderme através de cinco linhas perpendiculares ao estrato córneo foi um método reproduzido a partir de dissertação sobre o tema, com o uso do programa de computador adequado para a realização das medidas, assim como nosso estudo. (PAULA, 2010) Essa técnica é facilmente reproduzível, devendo-se tomar o cuidado de medir toda a extensão da mesma e evitar a medida nos locais que apresentam cristas epidérmicas ou cortes oblíquos, o que poderia causar grande viés no momento da análise.

Em alguns momentos, foi inevitável o posicionamento de traçados em regiões da epiderme cujo corte não tenha sido totalmente transversal, ou seja, regiões em que o corte tenha sido oblíquo, e não totalmente perpendicular à superfície epidérmica no momento da clivagem. Por mais que tenhamos nos empenhado em clivar com grande cuidado e sempre perpendicular à superfície, foi inevitável que algumas regiões se apresentassem mais oblíquas que outras devido à extrema rugosidade do prepúcio.

No momento das medidas, portanto, procuramos evitar estes locais oblíquos; além disso, a medida em vários pontos percorrendo toda a extensão da amostra nos permitiu minimizar o viés dessa análise.

Uma possível crítica a este método seria o fato de ser avaliador-dependente, ou seja, o pesquisador que faz a medida poderia posicionar as linhas nos locais mais apropriados para o resultado almejado. Para evitar tal viés, foi imprescindível o correto posicionamento das linhas buscando a divisão simétrica em toda a extensão da epiderme, dividindo a mesma em seis partes através de cinco linhas perpendiculares. Além disso, as medidas foram realizadas por pesquisador cego, ou seja, que desconhecia qual hormônio havia sido administrado em cada amostra mensurada, o que certamente aumentou ainda mais a confiabilidade dos nossos resultados.

Achados relativos à boa cicatrização na avaliação histológica do prepúcio são fundamentais para a correção da hipospádia, não só devido ao benefício estético, mas sobretudo por aumentar a confiança dos retalhos e enxertos oriundos desse tecido (SNODGRASS e BUSH, 2016). Dessa forma, a boa cicatrização do prepúcio estaria relacionada a uma menor incidência de complicações como fístulas e deiscências.

Nosso estudo é focado em área ainda pouco explorada pelos pesquisadores de urologia pediátrica, visto que são escassos os trabalhos que pesquisam aspectos histológicos relacionados à cicatrização do prepúcio nesses pacientes, e torna-se inédito quando aliamos a isso o fato de estudarmos os efeitos do estradiol no prepúcio de pacientes com hipospádia.

Entretanto, reconhecemos que existem questionamentos quanto à real aplicabilidade de nossa pesquisa na prática clínica diária da urologia pediátrica, uma vez que nossos achados se limitam a análises histológicas, e muitas vezes as alterações encontradas ao nível tecidual não se refletem em benefícios clínicos evidentes e concretos. Dessa forma, existe, sim, a possibilidade de que o evidente aumento da espessura da epiderme e do colágeno dérmico proporcionados pelo estradiol ainda assim não sejam capazes de oferecer melhora nos índices de complicações relacionadas à cicatrização desses pacientes. Entretanto, essa hipótese deve ser contestada através de novos estudos.

Os resultados aqui apresentados, por outro lado, sinalizam para provável benefício

no uso do estradiol em meninos com hipospádia. Pesquisas prévias demonstrando resultados satisfatórios em outros sítios anatômicos aliadas aos achados histológicos em nossos pacientes fazem com que seja levantada a hipótese de que o estradiol esteja relacionado à melhora na cicatrização de meninos com hipospádia. De qualquer forma, essa associação não pode ser afirmada baseada apenas em nossos achados, uma vez que não foi estudado o real impacto de nossos resultados no pós-operatório dos pacientes estudados.

Assim, o aumento da espessura epidérmica e do colágeno dérmico podem de fato estar associados à menor incidência de complicações pós-operatórias, mas tal associação deve ser pesquisada em novos estudos voltados para esse objetivo.

7 CONCLUSÃO

Ocorreram alterações histológicas ao nível de epiderme e derme prepucial associadas ao uso da terapia hormonal tópica pré-operatória.

A administração do estradiol tópico foi relacionada à maior espessura da epiderme do tecido prepucial.

A administração do estradiol tópico foi relacionada à maior expressão do colágeno tipo I na derme do prepúcio.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; CHANA, R. S.; ALI, S. M.; KHAN, S. Role of parenteral testosterone in hypospadias: A study from a teaching hospital in India. **Urol Ann**, v. 3, n. 3, p. 138-40, Sep 2011.
- ASGARI, S. A.; SAFARINEJAD, M. R.; POORREZA, F.; ASL, A. S.; GHANAIE, M. M.; SHAHAB, E. The effect of parenteral testosterone administration prior to hypospadias surgery: A prospective, randomized and controlled study. **J Pediatr Urol**, v. 11, n. 3, p. 143 e1-6, Jun 2015.
- ASHCROFT, G. S.; ASHWORTH, J. J. Potential role of estrogens in wound healing. **Am J Clin Dermatol**, v. 4, n. 11, p. 737-43, 2003.
- ASHCROFT, G. S.; GREENWELL-WILD, T.; HORAN, M. A.; WAHL, S. M.; FERGUSON, M. W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. **Am J Pathol**, v. 155, n. 4, p. 1137-46, Oct 1999.
- ASHCROFT, G. S.; MILLS, S. J.; LEI, K.; GIBBONS, L.; JEONG, M. J.; TANIGUCHI, M.; BUROW, M.; HORAN, M. A.; WAHL, S. M.; NAKAYAMA, T. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. **J Clin Invest**, v. 111, n. 9, p. 1309-18, May 2003.
- BABU, R.; CHAKRAVARTHI, S. The role of preoperative intra muscular testosterone in improving functional and cosmetic outcomes following hypospadias repair: A prospective randomized study. **J Pediatr Urol**, Aug 12 2017.
- BASKIN, L. S. Hypospadias and urethral development. **J Urol**, v. 163, n. 3, p. 951-6, Mar 2000.
- BASKIN, L. S.; HIMES, K.; COLBORN, T. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? **Environ Health Perspect**, v. 109, n. 11, p. 1175-83, Nov 2001.
- BASTOS, A. N. **Aspectos morfológicos do prepúcio de crianças portadores de hipospádia com e sem o uso de creme de testosterona a 1%**. 2009.
- BASTOS, A. N.; OLIVEIRA, L. R.; FERRAREZ, C. E.; DE FIGUEIREDO, A. A.; FAVORITO, L. A.; BASTOS NETTO, J. M. Structural study of prepuce in hypospadias--does topical treatment with testosterone produce alterations in prepuce vascularization? **J Urol**, v. 185, n. 6 Suppl, p. 2474-8, Jun 2011.
- BUSH, N. C.; VILLANUEVA, C.; SNODGRASS, W. Glans size is an independent risk factor for urethroplasty complications after hypospadias repair. **J Pediatr Urol**, v. 11, n. 6, p. 355 e1-5, Dec 2015.
- CELAYIR, S.; ELICEVIK, M.; TIRELI, G.; DERVISOGLU, S.; SANDER, S. Expression of estrogen and androgen receptors in children with hypospadias: preliminary report. **Arch Androl**, v. 53, n. 2, p. 83-5, Mar-Apr 2007.
- CHALAPATHI, G.; RAO, K. L.; CHOWDHARY, S. K.; NARASIMHAN, K. L.; SAMUJH, R.; MAHAJAN, J. K. Testosterone therapy in microphallic hypospadias: topical or parenteral? **J Pediatr Surg**, v. 38, n. 2, p. 221-3, Feb 2003.

DA SILVA, E. A.; LOBOUNTCHENKO, T.; MARUN, M. N.; RONDON, A.; DAMIAO, R. Role of penile biometric characteristics on surgical outcome of hypospadias repair. **Pediatr Surg Int**, v. 30, n. 3, p. 339-44, Mar 2014.

DEVINE, C. J., JR.; HORTON, C. E. Hypospadias repair. **J Urol**, v. 118, n. 1 Pt 2, p. 188-93, Jul 1977.

DINH, M. H.; MCRAVEN, M. D.; KELLEY, Z.; PENUGONDA, S.; HOPE, T. J. Keratinization of the adult male foreskin and implications for male circumcision. **AIDS**, v. 24, n. 6, p. 899-906, Mar 27 2010.

FOWLER-KERRY, S.; LANDER, J. R. Management of injection pain in children. **Pain**, v. 30, n. 2, p. 169-75, Aug 1987.

GILLIVER, S. C.; ASHCROFT, G. S. Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. **Climacteric**, v. 10, n. 4, p. 276-88, Aug 2007.

GILLIVER, S. C.; ASHWORTH, J. J.; ASHCROFT, G. S. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 1, p. 56-62, Jan-Feb 2007.

GILLIVER, S. C.; ASHWORTH, J. J.; MILLS, S. J.; HARDMAN, M. J.; ASHCROFT, G. S. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 4, p. 722-32, Feb 15 2006.

GILLIVER, S. C.; WU, F.; ASHCROFT, G. S. Regulatory roles of androgens in cutaneous wound healing. **Thromb Haemost**, v. 90, n. 6, p. 978-85, Dec 2003.

GORDUZA, D. B.; GAY, C. L.; DE MATTOS, E. S. E.; DEMEDE, D.; HAMEURY, F.; BERTHILLER, J.; MURE, P. Y.; MOURIQUAND, P. D. Does androgen stimulation prior to hypospadias surgery increase the rate of healing complications? - A preliminary report. **J Pediatr Urol**, v. 7, n. 2, p. 158-61, Apr 2011.

HAYASHI, Y.; MIZUNO, K.; KOJIMA, Y.; MORITOKI, Y.; NISHIO, H.; KATO, T.; KUROKAWA, S.; KAMISAWA, H.; KOHRI, K. Characterization of the urethral plate and the underlying tissue defined by expression of collagen subtypes and microarchitecture in hypospadias. **Int J Urol**, v. 18, n. 4, p. 317-22, Apr 2011.

HSIEH, M. H.; BREYER, B. N.; EISENBERG, M. L.; BASKIN, L. S. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. **Curr Urol Rep**, v. 9, n. 2, p. 137-42, Mar 2008.

JESMIN, S.; MOWA, C. N.; MATSUDA, N.; SALAH-ELDIN, A. E.; TOGASHI, H.; SAKUMA, I.; HATTORI, Y.; KITABATAKE, A. Evidence for a potential role of estrogen in the penis: detection of estrogen receptor-alpha and -beta messenger ribonucleic acid and protein. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4764-74, Dec 2002.

JOSEPH, D.B.; PEREZ, L.M. Tunica vaginalis onlay urethroplasty as a salvage repair. **The Journal of Urology**, v. 162, n. 3, p. 1146 - 1147, 1999.

KAYA, C.; BEKTIC, J.; RADMAYR, C.; SCHWENTNER, C.; BARTSCH, G.; OSWALD, J. The efficacy of dihydrotestosterone transdermal gel before primary hypospadias surgery: a prospective, controlled, randomized study. **J Urol**, v. 179, n. 2, p. 684-8, Feb 2008.

LOWRY, R. B.; THUNEM, N. Y.; SILVER, M. Congenital anomalies in American Indians of British Columbia. **Genet Epidemiol**, v. 3, n. 6, p. 455-67, 1986.

LUND, L.; ENGEBJERG, M. C.; PEDERSEN, L.; EHRENSTEIN, V.; NORGAARD, M.; SORENSEN, H. T. Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005. **Eur Urol**, v. 55, n. 5, p. 1022-6, May 2009.

MAHEUX, R.; NAUD, F.; RIOUX, M.; GRENIER, R.; LEMAY, A.; GUY, J.; LANGEVIN, M. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, n. 2, p. 642-9, Feb 1994.

MALIK, R. D.; LIU, D. B. Survey of pediatric urologists on the preoperative use of testosterone in the surgical correction of hypospadias. **J Pediatr Urol**, v. 10, n. 5, p. 840-3, Oct 2014.

MANZONI, G.; BRACKA, A.; PALMINTERI, E.; MARROCCO, G. Hypospadias surgery: when, what and by whom? **BJU Int**, v. 94, n. 8, p. 1188-95, Nov 2004.

MARCOS-GARCES, V.; MOLINA AGUILAR, P.; BEA SERRANO, C.; GARCIA BUSTOS, V.; BENAVENT SEGUI, J.; FERRANDEZ IZQUIERDO, A.; RUIZ-SAURI, A. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. **J Anat**, v. 225, n. 1, p. 98-108, Jul 2014.

MENON, P.; RAO, K. L. N.; HANDU, A.; BALAN, L.; KAKKAR, N. Outcome of urethroplasty after parenteral testosterone in children with distal hypospadias. **J Pediatr Urol**, v. 13, n. 3, p. 292 e1-292 e7, Jun 2017.

NERLI, R. B.; KOURA, A.; PRABHA, V.; REDDY, M. Comparison of topical versus parenteral testosterone in children with microphallic hypospadias. **Pediatr Surg Int**, v. 25, n. 1, p. 57-9, Jan 2009.

NETTO, J. M.; FERRAREZ, C. E.; SCHINDLER LEAL, A. A.; TUCCI, S., JR.; GOMES, C. A.; BARROSO, U., JR. Hormone therapy in hypospadias surgery: a systematic review. **J Pediatr Urol**, v. 9, n. 6 Pt B, p. 971-9, Dec 2013.

PAIVA, K. C.; BASTOS, A. N.; MIANA, L. P.; BARROS EDE, S.; RAMOS, P. S.; MIRANDA, L. M.; FARIA, N. M.; AVARESE DE FIGUEIREDO, A.; DE BESSA, J., JR.; NETTO, J. M. Biometry of the hypospadiac penis after hormone therapy (testosterone and estrogen): A randomized, double-blind controlled trial. **J Pediatr Urol**, v. 12, n. 4, p. 200 e1-6, Aug 2016.

PASK, A. J.; MCINNES, K. J.; WEBB, D. R.; SHORT, R. V. Topical oestrogen keratinises the human foreskin and may help prevent HIV infection. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2308, Jun 04 2008.

PAULA, G. S. **Estudo estrutural da epiderme de pacientes desnutridos**. 2010. 120 Patologia Geral, Universidade Federal do Triângulo Mineiro

QIAO, L.; RODRIGUEZ, E., JR.; WEISS, D. A.; FERRETTI, M.; RISBRIDGER, G.; CUNHA, G. R.; BASKIN, L. S. Expression of estrogen receptor alpha and beta is decreased in hypospadias. **J Urol**, v. 187, n. 4, p. 1427-33, Apr 2012.

ROTH, C. C.; FRIMBERGER, D.; KROPP, B. P. Re: The efficacy of dihydrotestosterone transdermal gel before primary hypospadias surgery: a prospective, controlled, randomized study. **J Urol**, v. 180, n. 2, p. 786; author reply 786-7, Aug 2008.

RYNJA, S. P.; DE JONG, T.; BOSCH, J.; DE KORT, L. M. O. Testosterone prior to hypospadias repair: Postoperative complication rates and long-term cosmetic results, penile length and body height. **J Pediatr Urol**, v. 14, n. 1, p. 31 e1-31 e8, Feb 2018.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **J Dermatol Sci**, v. 37, n. 2, p. 65-73, Feb 2005.

SNODGRASS, W.; BUSH, N. Primary hypospadias repair techniques: A review of the evidence. **Urol Ann**, v. 8, n. 4, p. 403-408, Oct-Dec 2016.

SON, E. D.; LEE, J. Y.; LEE, S.; KIM, M. S.; LEE, B. G.; CHANG, I. S.; CHUNG, J. H. Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgfbeta signaling in aged human skin in vivo. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 6, p. 1149-61, Jun 2005.

SPINOIT, A. F.; POELAERT, F.; GROEN, L. A.; VAN LAECKE, E.; HOEBEKE, P. Hypospadias repair at a tertiary care center: long-term followup is mandatory to determine the real complication rate. **J Urol**, v. 189, n. 6, p. 2276-81, Jun 2013.

STERN, J. M.; CHEN, J.; PETERS, S. B.; STAHL, P. J.; EL-CHAAR, M.; FELSEN, D.; POPPAS, D. P. Testosterone treatment of human foreskin in a novel transplant model. **Urology**, v. 63, n. 5, p. 999-1003, May 2004.

TUNCALI, D.; BINGUL, F.; TALIM, B.; SURUCU, S.; SAHIN, F.; ASLAN, G. Histologic characteristics of the human prepuce pertaining to its clinical behavior as a dual graft. **Ann Plast Surg**, v. 54, n. 2, p. 191-5, Feb 2005.

VAN DER HORST, H. J.; DE WALL, L. L. Hypospadias, all there is to know. **Eur J Pediatr**, v. 176, n. 4, p. 435-441, Apr 2017.

VERDIER-SEVRAIN, S.; YAAR, M.; CANTATORE, J.; TRAISH, A.; GILCHREST, B. A. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. **FASEB J**, v. 18, n. 11, p. 1252-4, Aug 2004.

WANG, X. J.; ZHUO, J.; LUO, G. H.; ZHU, Y. P.; YU, D. J.; ZHAO, R. Z.; JIANG, C. Y.; SHI, Y. F.; LI, H.; CHEN, L. *et al.* Androgen Deprivation Accelerates the Prostatic Urethra Wound Healing After Thulium Laser Resection of the Prostate by Promoting Re-Epithelialization and Regulating the Macrophage Polarization. **Prostate**, v. 77, n. 7, p. 708-717, May 2017.

WEIDNER, I. S.; MOLLER, H.; JENSEN, T. K.; SKAKKEBAEK, N. E. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. **J Urol**, v. 161, n. 5, p. 1606-9, May 1999.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. **Maturitas**, v. 103, p. 60-64, Sep 2017.

WONG, N. C.; BRAGA, L. H. The influence of pre-operative hormonal stimulation on hypospadias repair. **Front Pediatr**, v. 3, p. 31, 2015.

WRIGHT, I.; COLE, E.; FARROKHYAR, F.; PEMBERTON, J.; LORENZO, A. J.; BRAGA, L. H. Effect of preoperative hormonal stimulation on postoperative complication rates after proximal hypospadias repair: a systematic review. **J Urol**, v. 190, n. 2, p. 652-59, Aug 2013.

ZHOU, T.; YANG, Z.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; HUANG, Z.; YOU, B.; PENG, Y.; CHEN, J. Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting Proliferation of Epidermal Keratinocytes via Erk/Akt Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 3, p. 959-68, 2016.

APÊNDICE 1

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF - PRO-REITORIA DE PESQUISA

CIDADE UNIVERSITARIA - 36036-900 - JUIZ DE FORA - MG – BRASIL

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA / SERVIÇO DE UROLOGIA PEDIÁTRICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. José Murillo Bastos Netto

ENDEREÇO: Hospital Universitário / Centro de Atenção à Saúde (HU-CAS) da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

TEL: (32) 4009-5199

E-MAIL: jmbnetto@uropedjf.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado, como voluntário, a participar da pesquisa **“Estudo Morfológico e Histoquímico sobre a Resposta Tecidual ao tratamento tópico com Estradiol X Testosterona no pré-operatório de pacientes com Hipospádia - Ensaio Clínico Randomizado Duplo-Cego”** que tem como objetivo verificar as ações decorrentes do uso dos hormônios testosterona tópica e estrogênio tópico no pré-operatório da cirurgia de correção de hipospádia. O estudo será feito a partir de medidas do pênis, dosagens hormonais no sangue, ecocardiograma e amostras da pele que recobre o pênis, obtidas durante a cirurgia. Os fragmentos de pele a serem usados no estudo são jogados fora rotineiramente ao final da cirurgia, não acarretando, portanto, danos ou prejuízos ao paciente. O uso de testosterona tópica e estrogênio no preparo para cirurgia de hipospádia são práticas de uso rotineiro em todo mundo e melhoram as condições do pênis para a cirurgia da hipospádia, proporcionando melhores resultados estéticos e menos complicações decorrentes da operação. Os efeitos colaterais observados quando se usa esses hormônios são, principalmente, o aumento do pênis (efeito desejado e objetivo do uso de testosterona tópica e estrogênio) e aparecimento de pequena quantidade de pêlos próximo ao pênis, que normalmente desaparecem algum tempo após terminado o uso do hormônio. A irritação da pele, no caso do uso da testosterona tópica, também pode ocorrer. Seu filho poderá também receber um creme placebo, ou seja, que não tem nenhum efeito sobre o pênis.

Durante o estudo, serão feitos exames de sangue três vezes. Uma vez logo após a primeira consulta, uma na internação para a cirurgia e por fim, outra coleta de sangue com 3 meses após a cirurgia. Esses exames são para dosagem das taxas hormonais e do colesterol. Junto com esses exames de sangue, serão feitos também exames de ecocardiograma (ultra-sonografia do coração), para avaliar a função do coração antes e após o uso do hormônio. Exames esses de mínimos riscos para a criança.

Para participar deste estudo o(a) senhor(a) e o menor sob sua responsabilidade não terão nenhum custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. O(a) senhor(a) será esclarecido sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação, bem como a do

menor sob sua responsabilidade, são voluntárias e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que são atendidos pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade e a da criança pelo qual é responsável, com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome, o nome do menor pelo qual é responsável, ou qualquer material que indique a participação de vocês não será liberado sem a sua permissão. O(a) senhor(a) e o menor sob sua responsabilidade não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao senhor(a). Não estão previstos riscos diferentes daqueles habituais de toda criança que é submetida à cirurgia de hipospádia e recebe tratamento prévio com hormônios.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo pesquisa “AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA E MORFOLÓGICA DO PÊNIS, PREPÚCIO E MIOCÁRDIO DE CRIANÇAS PORTADORAS DE HIPOSPÁDIA ANTES E APÓS ESTÍMULO HORMONAL.”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar do estudo, se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo, assim como permito a participação do menor sob minha responsabilidade. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20 ____.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Data

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

Nome da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o:

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF - Campus Universitário da UFJF - Pró-Reitoria de Pesquisa - CEP 36036.900 - Fone: (32) 3220-3788

APÊNDICE 2

Accepted Manuscript

Topical Estradiol Increases Epidermal Thickness And Dermal Collagen Of Foreskin Prior To Hypospadias Surgery - Randomized Double Blinded Controlled Trial

Thaís Gomes Casali, Kelly Christina de Castro Paiva, Matheus Nehrer Rodrigues, Caroline Elizabete Santana Silva, André Avarese de Figueiredo, José de Bessa, Jr., André Netto Bastos, Maria Christina Marques Nogueira Castañon, José Murillo Bastos Netto



PII: S1477-5131(19)30137-8

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2019.05.014>

Reference: JPUROL 3163

To appear in: *Journal of Pediatric Urology*

Received Date: 8 February 2019

Accepted Date: 2 May 2019

Please cite this article as: Casali TG, Christina de Castro Paiva K, Rodrigues MN, Santana Silva CE, Avarese de Figueiredo A, de Bessa Jr J, Bastos AN, Marques Nogueira Castañon MC, Bastos Netto JM, Topical Estradiol Increases Epidermal Thickness And Dermal Collagen Of Foreskin Prior To Hypospadias Surgery - Randomized Double Blinded Controlled Trial, *Journal of Pediatric Urology*, <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2019.05.014>.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

**TOPICAL ESTRADIOL INCREASES EPIDERMAL THICKNESS AND
DERMAL COLLAGEN OF FORESKIN PRIOR TO HYPOSPADIA SURGERY -
RANDOMIZED DOUBLE BLINDED CONTROLLED TRIAL**

**Running head: Topical estradiol stimulates epidermal proliferation and collagen
deposition in boys with hypospadia**

Thaís Gomes Casali^{1,2}, Kelly Christina de Castro Paiva^{1,2}, Matheus Nehrer Rodrigues³,
Caroline Elizabete Santana Silva¹, André Avarese de Figueiredo¹, José de Bessa Jr⁴,
André Netto Bastos³, Maria Christina Marques Nogueira Castañon³, José Murillo
Bastos Netto^{1,2}

1 - Department of Surgery – Federal University of Juiz de Fora (UFJF),
Minas Gerais, Brazil

2 - Department of Surgery - Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus of
the School of Medical Science and Health of Juiz de Fora (HMTJ-
SUPREMA), Minas Gerais, Brazil

3 - Department of Morphology - Federal University of Juiz de Fora
(UFJF), Minas Gerais, Brazil

4 - Department of Surgery – State University of Feira de Santana (UEFS),
Bahia, Brazil

Correspondence Address:

Thaís Gomes Casali

e-mail: casalithais@hotmail.com (TGC)

Rua Ivo José Curi 233, São Pedro. Juiz de Fora, MG, 36037-467

Acknowledgements

This study was funded by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas
Gerais).

Summary

INTRODUCTION: The use of preoperative topical testosterone stimulation prior to hypospadias correction aims to increase penile size and achieve better surgical results. Topical estradiol has been shown to improve the quality of skin in other sites, but its use in boys with hypospadias has not yet been elucidated. **This study aims to evaluate the primary effects in epidermal thickness and collagen distribution of estradiol compared to testosterone and placebo in skin of prepuce before hypospadias surgery.**

MATERIALS AND METHODS: Patients were randomized into three groups according to the topical hormone used: TG: Testosterone ointment; EG: Estradiol ointment; CG: Neutral base ointment. Fragments of foreskin were excised, fixed and then sectioned for histology. For each sample, epidermal thickness and dermal collagen expression was measured by specific computer analysis, p-values of <0.05.

RESULTS: Thirty-three patients with a mean age of 4.01 ± 2.92 years were included. Hypospadias classification was similar in all three groups. Mean epidermal thickness and collagen type I expression in EG were greater than those of the other groups. Collagen type III expression was similar in all groups.

DISCUSSION: Foreskin has a fundamental role in many techniques of hypospadias surgery and can be used either as a graft or a flap in the correction of the penile defect. Increase of epidermal thickness and dermal collagen observed in the present study has already been related to use of estradiol in other skin sites, but not yet in foreskin. Further studies are needed to evaluate the real significance of these findings in boys with hypospadias.

CONCLUSION: Use of topical estradiol before hypospadias surgery lead to greater epidermal thickness and **increases** dermal collagen expression in foreskin.

KEYWORDS

Hypospadias. Children. Estradiol. Testosterone. Wound healing.

Introduction

Hypospadias is a common congenital abnormality characterized by an ectopic urethral meatus along the ventral surface of the penis proximal to the normal glanular location.[1] Surgical repair of hypospadias is challenging even in experienced hands, especially in boys with a small-sized glans and penis [2]. Therefore, many surgeons suggest temporary enlargement of the penis, achieved by local or parenteral application of testosterone [3].

Nevertheless, the role of supplemental hormonal therapy before hypospadias surgery is still not clear. There is considerable controversy surrounding the use of androgen stimulation or supplementation before hypospadias repair for the improvement of surgical results. Subjects of debate include best agent, route, dose, dosing schedule, and timing of treatment to be employed as well as increase in vascularization. Typical indications for administering hormones are a small-appearing penis and/or glans and ventral curvature. [4] Some studies ^{[5],[6]} have demonstrated negative effects of androgens on the skin healing process, raising the question of potential adverse effects of preoperative topical hormonal stimulation in hypospadias surgery.

Satisfactory wound healing is important not only because of its aesthetical advantages, but also to improve safety of grafts, flaps, and to avoid dehiscence and fistulas. Despite more than 250 different techniques for hypospadias repair, successful outcome depends mainly on the surgeon's skills and the availability of appropriate tissue.[7] Bastos *et al.* [8], demonstrated that the use of topical testosterone prior to hypospadias surgery is associated with an increase of blood vessels density and number in foreskin. This neovascularization could be associated with a greater oxygenation in scar healing but to our knowledge the real effect of neovascularization on surgical results remains to be proved.

On the other hand, topical estradiol has been shown to improve the quality of skin and healing process.[9-12] It has already been studied in skin aging, as it prevents decline of collagen fibers.[13] In other sites, the use of topical estrogen accelerates healing, increases collagen deposition, and reduces inflammatory cell influx, but its histological findings in boys with hypospadias has not yet been elucidated. **We have hypothesized that topical hormones could determine significant histological changes in epidermal thickness and dermal collagen expression in foreskin of children with hypospadias.**

Patients and methods

A randomized, double-blinded controlled trial was conducted including 33 boys presenting with hypospadias and with age ranging from 6 months to 10 years. Children with other penile or genital abnormalities, previous genital surgery and those who have used hormone were not included in the study. The study was approved by the Research Ethics Committee of our institution, according to the norms of the Declaration of Helsinki. It was registered and adheres to CONSORT statement. Written informed consent was obtained from the responsible for all individual participants included in the study.

Thirty-three patients were randomized according to the type of hormone used into three groups using the software "Research Randomizer Form v4.0" (<http://www.randomizer.org/form.htm>). The groups were divided as follows: Control Group (CG): Placebo. Neutral base ointment; Testosterone Group (TG): 1% Testosterone propionate ointment; Estrogen Group (EG): 0.01% Estradiol ointment.

All patients received a tube of ointment not identified of its content. Surgeon and pathologist were also blinded. Mothers were instructed to use gloves when applying the ointments.

After randomization, patients were instructed to use the topical treatment (volume measured in a coffee scoop of approximately 5g) twice a day for 30 days, applying the ointment all over the penis. Surgical procedures were done 1 to 10 days after the end of treatment. Surgeries were performed in two different institutions, by two surgeons with 20-25 years of prior experience in performing the reported intervention, from April 2015 to December 2017. During surgery, a small segment (1.0 cm²) of the dorsal foreskin was removed and sent for histologic analysis.

Fragments of the foreskin were fixed in 10% formalin prior to paraffin embedding and sectioning for histology. Paraffin-embedded 4- μ m sections were stained with Hematoxylin Eosin (HE), Masson Trichrome (MT) and Picrosirius Red (PR). For each sample of HE-stained fragments, the keratinocytes layer was studied by measuring epidermal thickness in five different points by image analysis using a Zeiss camera and PC image capture system. [14] [15] Results were determined by measuring equidistant points in all epidermis extension. Measure was always perpendicular to epidermis edge, under stratum corneum till stratum basale, which means that was not necessarily vertical.

Picrosirius Red fragments were imaged using polarized light. Pictures of all dermis extension were taken. Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics was used to evaluate collagen expression. Type III collagen fibers was showed as green, and type I as red/orange.[16] We analyzed the incidence of pixels in color green and red in each picture.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0.3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Results were expressed as mean \pm standard deviation. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences among the three groups. Significant differences were defined as p-values of <0.05 .

Results

Thirty-three patients with a mean age of 4.01 ± 2.92 years were included. Thirteen subjects in the TG group (3.15 ± 2.64), and 10 in the EG group (3.8 ± 2.97) $p=0.2929$. Ten subjects were allocated to the CG group (5.10 ± 3.17 years old).

Hypospadias classification was similar in all three groups ($p=0.592$):

- TG – Coronal (5), Subcoronal (4), Midshaft (3) and Proximal (1);
- EG – Coronal (4), Subcoronal (5) and Midshaft (1);
- CG – Coronal (4), Subcoronal (5), and Midshaft (1);

Mean epidermal thickness (MET) in foreskin of boys who received estradiol was greater than those of the other groups ($p < 0.0001$): (Figure 1)

- MET in TG was $20.84 \pm 7.34 \mu\text{m}$ (12.05–40.76)
- MET in EG was $33.67 \pm 5.53 \mu\text{m}$ (26.16 – 44.63)
- MET in CG was $18.99 \pm 4.54 \mu\text{m}$ (13.68-29.69)

When the groups were paired, EG showed greater MET than CG ($p < 0.0001$), and TG ($p < 0.0001$). MET in CG and TG were similar ($p = 0.4760$)

Under polarized light, collagen fibers are easily differentiated from the black background, thus allowing for quantitative morphometric analysis. Collagen fibers appear red or green, representing type I or type III collagen content, respectively. (Figure 2)

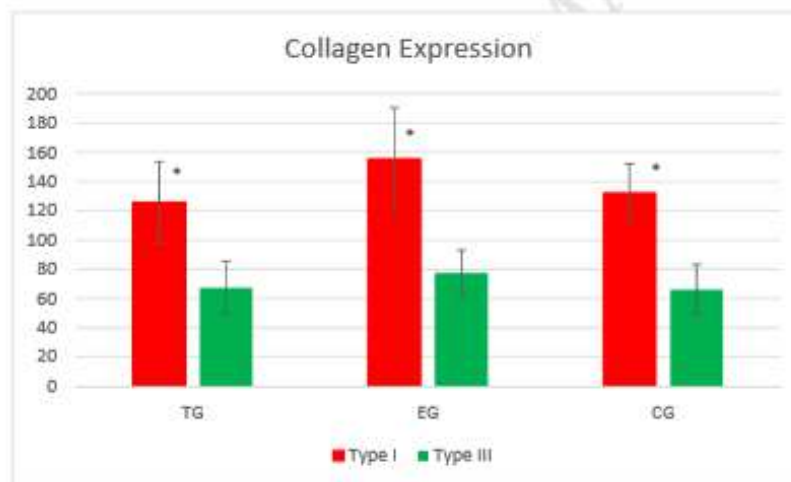
Mean collagen type I expression in EG was higher than CG and TG (TG: 125.8 ± 27.72 pixels; EG: 155.6 ± 34.85 pixels; CG: 132.2 ± 19.81 pixels) ($p = 0.032$). **Collagen type III expression was similar in all three groups** (TG: 67.18 ± 18.08 pixels; EG: 77.39 ± 15.61 pixels; CG: 66.17 ± 17.12 pixels) ($p = 0.2709$). (Graphic 1)

Expression of collagen type I was:

- TG: 125.8 ± 27.72 pixels
- EG: 155.6 ± 34.85 pixels
- CG: 132.2 ± 19.81 pixels

Expression of collagen type III was:

- TG: 67.18 ± 18.08 pixels,
- EG: 77.39 ± 15.61 pixels,
- CG: 66.17 ± 17.12 pixels.



Graphic 1: Expression of collagen type I ($p = 0.0328$) and type III ($p = 0.2709$) expression in groups Testosterone (TG), Estradiol (EG) and Control (CG), in pixels.

Discussion

To our knowledge this is the first study on the effects of estrogen on the prepuce of children with hypospadias. The present data demonstrates that use of topical estradiol on the penis 30 days prior to hypospadias surgery increases epidermal thickness and collagen type I expression in the foreskin. This adds to our previous study that has shown no side effects and no changes on penile biometry after estrogen stimulation. [3]

Foreskin has a fundamental role in many techniques of hypospadias surgery and can be used either as a graft or a flap in the correction of the penile defect. [2] Increase of epidermal thickness and dermal collagen observed in the present study has already been related to use of estradiol in other skin sites [11, 17, 12] but not yet in foreskin.

The proliferation stage of healing entails a local increase in epidermal cell division to replace those cells destroyed by wounding. It involves migration of epidermal cells over the wound site (reepithelialization). Therefore, epidermal proliferation is of paramount importance for wound repair. It is already well known that keratinocytes are responsible for restoring the epidermis after injury through the epithelialization process. Complex interactions and cross-talk between keratinocytes, fibroblasts, inflammatory cells, and other types of cells during wound healing are critical for successful wound closure and healing. [18]

The dermal structural support depends primarily on the composition of the dermal extra cellular matrix, which is mainly composed of collagens. Collagens are a family of extracellular matrix proteins that play a dominant role in connective tissue healing, by providing strength for the skin and an extracellular matrix framework for cell adhesion and migration. Collagen type III is codistributed with type I in tissues and their relative proportions may change during wound healing. [19]

Collagen type III is also referred as “new” or “immature” collagen and collagen type I as “old” or “mature” collagen. Immature (type III) collagen increases when skin is damaged, which was not observe in our patients. Since this is the first study that evaluate collagen levels after topical estradiol in foreskin, we don't have any previous literature to compare our results. It's known that unwounded dermis contains approximately 80% type I

collagen and 20% type III collagen. Acute wound granulation tissue, in contrast, expresses 30% to 40% type III collagen.[20]

The process of remodeling involves reorganization of immature collagen to a more organized extracellular matrix. In the adult, this occurs with a change from type III collagen to predominately type I collagen and extensive cross-linking of the collagen molecules. Witte *et al.* showed that higher levels of collagen type I are associated with higher strength of the wound, and collagen type III does not contribute to the strength of the wound.[20] **EG showed a significant increase of type I collagen deposition, which may lead to a higher strength of the wound in this group, on the other hand, collagen type III does not contribute to wound strength and did not have a significant increase in our study.**

Furth *et al.* [21] reported a high expression of type I and III procollagens in fetal dermis that remained partially elevated during the postnatal period to decrease later with skin maturation. In our study, mean age was similar in all three groups, therefore, the groups were comparable regarding age, and it could not be interpreted as a confounding factor. There is a high density of collagen fibers existing at birth that remains constant until adulthood in the papillary dermis, but not in the reticular dermis, where it diminishes progressively. This is a limitation of our study, since we didn't measure collagen expression in each dermal layer, separately.

In normal tissues, a greater amount of collagen was already proven to be beneficial for older menopausal women because of its aesthetical benefits.[22] We have previously showed a reduced collagen deposition with higher incidence of immature forms associated to topical testosterone prior to hypospadias surgery, which could be correlated to a worse healing process.[23] **Nevertheless, in the present study we did not observe the same changes in collagen levels in those receiving testosterone treatment, and we believe that this needs to be better elucidated in further studies.**

Gilliver *et al.* [13] studied effects of androgens and estrogens in scar healing, and showed that estrogens are associated to rapid healing and androgens slowed down the repair of the damaged dermis. Penile skin has hormone receptors, both to estradiol and testosterone, as shown in other study. [24] **Gorduza *et al.* showed higher rates of complications when topical testosterone was used before surgery in children with hypospadias, and referred to those complications**

as healing failure, although in their study most of the patients that used testosterone were those with more severe hypospadias. [25] On the other hand, other previous studies and two recent meta-analyses have shown satisfactory results with androgen therapy prior to hypospadias. [4,20-22]

It's already known that topical application of 17 β -estradiol to aged human skin increases the amount of collagen and the proliferation of epidermal keratinocytes, leading to a thickening of the skin. [12] Using a computerized image analysis of biopsy samples, Sauerbronn *et al.*, found an increase of 6.49% of collagen fibers in the dermis and no significant change in epidermal thickness after six months of treatment with estradiol valerate and cyproterone acetate. [26]

Estradiol seems to have effects also on damaged skin, improving wound healing. Previous studies have already established that estrogen is capable of accelerating cutaneous wound healing through multiple mechanisms, one of which involves affecting keratinocytes biological properties, such as migration and proliferation.[27] Estrogens may accelerate the healing response via modulation of cytokines that influence matrix production, wound contraction, and angiogenesis.[9, 11]

The expression of cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) is tightly regulated by estrogens during wound healing by the proliferating epidermis, endothelial cells and infiltrating inflammatory cells. MIF has emerged as a key mediator of the enhancement of cutaneous repair by estrogens. [28] **Interestingly, administration of anti-MIF antibodies induces a delay in wound healing in vivo, which suggests a potential role of MIF in wound healing. In vitro assays have shown a striking estrogen mediated decrease in MIF production from activated murine macrophages, a process involving the estrogen receptor. Estrogen inhibits the local inflammatory response by downregulating MIF, suggesting a specific target for future therapeutic intervention in impaired wound-healing states. [29]**

Nevertheless, there is only one study that showed clinical aspects of topical estradiol in the penis of boys with hypospadias. Paiva *et al.*, [3] studied 69 boys after the use of topical estradiol, testosterone and placebo, and concluded that preoperative use of topical testosterone increases penile size but the use of estradiol does not change penile biometry. No side effects nor alterations in serum hormone levels were found in those who used estrogen.

We are aware of the limitations of our study, which includes **only histological analysis on epidermal thickness and collagen expression and no other analysis such as MIF or clinical outcomes were evaluated. Even though, our findings should be of value since it includes a new approach to hormonal stimulation for hypospadias surgery that has already been proved to be safe, [3] and it can lead to new studies** searching for clinical events related to healing after surgery in this group of patients to confirm if topical estradiol could be related to better wound healing **and results** in this group of patients.

Studies are still needed on histological findings related to the use of topical estradiol in the foreskin of boys with hypospadias. Previous good results in skin of other sites combined with our recent finding of epidermis thickness and dermal collagen improvement could prompt a potential benefit of using estradiol before hypospadias surgery, but still need to be replicated.

Conclusion

The use of topical estradiol before hypospadias surgery stimulates epidermal growth and collagen production, leading to greater skin thickness in prepuce. Further studies are needed to evaluate the real significance of these findings in boys with hypospadias.

Conflict of interest

The Authors declare that there is no conflict of interest.

The study was approved by the Research Ethics Committee of our institution, according to the norms of the Declaration of Helsinki

References

1. Hadidi AT. History of hypospadias: Lost in translation. *J Pediatr Surg.* 2017;52(2):211-7. doi:10.1016/j.jpedsurg.2016.11.004.
2. Snodgrass W, Bush N. Primary hypospadias repair techniques: A review of the evidence. *Urol Ann.* 2016;8(4):403-8. doi:10.4103/0974-7796.192097.
3. Paiva KC, Bastos AN, Miana LP, Barros Ede S, Ramos PS, Miranda LM et al. Biometry of the hypospadiac penis after hormone therapy (testosterone and estrogen): A randomized, double-blind controlled trial. *J Pediatr Urol.* 2016;12(4):200 e1-6. doi:10.1016/j.jpuro.2016.04.013.
4. Nerli RB, Koura A, Prabha V, Reddy M. Comparison of topical versus parenteral testosterone in children with microphallic hypospadias. *Pediatr Surg Int.* 2009;25(1):57-9. doi:10.1007/s00383-008-2278-6.
5. Gilliver SC, Ashworth JJ, Mills SJ, Hardman MJ, Ashcroft GS. Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 4):722-32. doi:10.1242/jcs.02786.
6. Gilliver SC, Wu F, Ashcroft GS. Regulatory roles of androgens in cutaneous wound healing. *Thromb Haemost.* 2003;90(6):978-85. doi:10.1160/TH03-05-0302.
7. van der Horst HJ, de Wall LL. Hypospadias, all there is to know. *Eur J Pediatr.* 2017;176(4):435-41. doi:10.1007/s00431-017-2864-5.
8. Bastos AN, Oliveira LR, Ferrarez CE, de Figueiredo AA, Favorito LA, Bastos Netto JM. Structural study of prepuce in hypospadias--does topical treatment with testosterone produce alterations in prepuce vascularization? *J Urol.* 2011;185(6 Suppl):2474-8. doi:10.1016/j.juro.2011.01.035.
9. Ashcroft GS, Ashworth JJ. Potential role of estrogens in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(11):737-43.
10. Verdier-Sevrain S, Yaar M, Cantatore J, Traish A, Gilchrist BA. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. *FASEB J.* 2004;18(11):1252-4. doi:10.1096/fj.03-1088fje.
11. Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* 1999;155(4):1137-46. doi:10.1016/S0002-9440(10)65217-0.
12. Son ED, Lee JY, Lee S, Kim MS, Lee BG, Chang IS et al. Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-Beta signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2005;124(6):1149-61. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23736.x.
13. Gilliver SC, Ashcroft GS. Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. *Climacteric.* 2007;10(4):276-88. doi:10.1080/13697130701456630.
14. Paula GS. Estudo estrutural da epiderme de pacientes desnutridos: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2010.
15. Limandjaja GC, van den Broek LJ, Waaijman T, van Veen HA, Everts V, Monstrey S et al. Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars. *Br J Dermatol.* 2017;176(1):116-26. doi:10.1111/bjd.14844.
16. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-6.
17. Maheux R, Naud F, Rioux M, Grenier R, Lemay A, Guy J et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(2):642-9.
18. Wang J, Wang X, Chen H, Liu J, Tredget EE, Wu Y. Distinctively Expressed Cytokines by Three Different Inflammation Cells and Their Interaction with Keratinocytes in Wound Healing. *Inflammation.* 2017;40(6):2151-62. doi:10.1007/s10753-017-0655-9.

19. Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y, Moritoki Y, Nishio H, Kato T et al. Characterization of the urethral plate and the underlying tissue defined by expression of collagen subtypes and microarchitecture in hypospadias. *Int J Urol*. 2011;18(4):317-22. doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02713.x.
20. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
21. Furth JJ, Allen RG, Tresini M, Keogh B, Cristofalo VJ. Abundance of alpha 1(I) and alpha 1(III) procollagen and p21 mRNAs in fibroblasts cultured from fetal and postnatal dermis. *Mech Ageing Dev*. 1997;97(2):131-42.
22. Castelo-Branco C, Duran M, Gonzalez-Merlo J. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 1992;15(2):113-9.
23. Netto JMB, A. N.; Fava, A. S.; Choi, M.; Figueiredo, A. A.; Favorito, L. A. Topical Testosterone Prior to Hypospadias Surgery A Histological Evaluation of the Effects on Collagen and Elastic Fibers. *Journal of Pediatric Urology*. 2010;6:1.
24. Jesmin S, Mowa CN, Matsuda N, Salah-Eldin AE, Togashi H, Sakuma I et al. Evidence for a potential role of estrogen in the penis: detection of estrogen receptor-alpha and -beta messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*. 2002;143(12):4764-74. doi:10.1210/en.2002-220628.
25. Gorduza DB, Gay CL, de Mattos ESE, Demede D, Hameury F, Berthiller J et al. Does androgen stimulation prior to hypospadias surgery increase the rate of healing complications? - A preliminary report. *J Pediatr Urol*. 2011;7(2):158-61. doi:10.1016/j.jpuro.2010.05.003.
26. Sauerbronn AV, Fonseca AM, Bagnoli VR, Saldiva PH, Pinotti JA. The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;68(1):35-41.
27. Zhou T, Yang Z, Chen Y, Chen Y, Huang Z, You B et al. Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting Proliferation of Epidermal Keratinocytes via Erk/Akt Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(3):959-68. doi:10.1159/000443048.
28. Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1309-18. doi:10.1172/JCI16288.
29. Shimizu T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *J Dermatol Sci*. 2005;37(2):65-73. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.08.007.

Fig 1. Histological examinations of the foreskin, 10X, original magnification. Arrows indicate epidermis.

A: Hematoxylin–eosin staining, epidermal thickness in Testosterone Group. Red lines indicate epidermal thickness measure.

B: Hematoxylin–eosin staining, epidermal thickness in Estradiol Group. Red lines indicate epidermal thickness measure.

C: Hematoxylin–eosin staining, epidermal thickness in Control Group. Red lines indicate epidermal thickness measure.

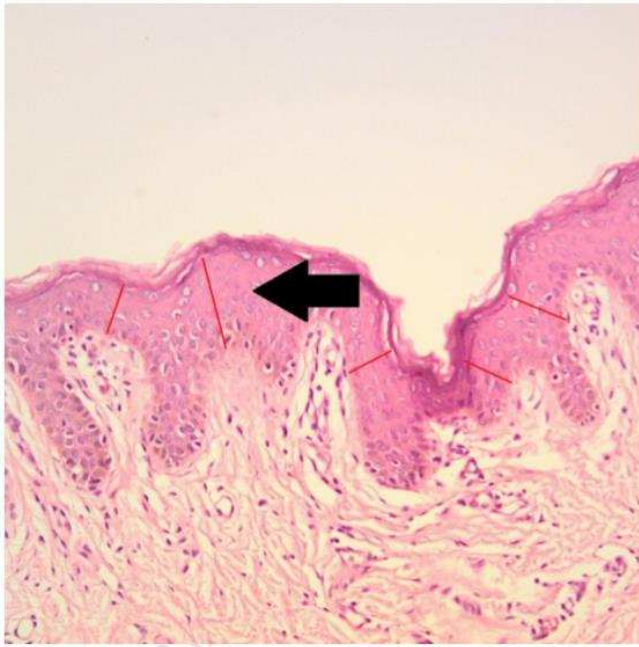
D: Masson Trichrome staining, epidermal thickness in Estradiol Group.

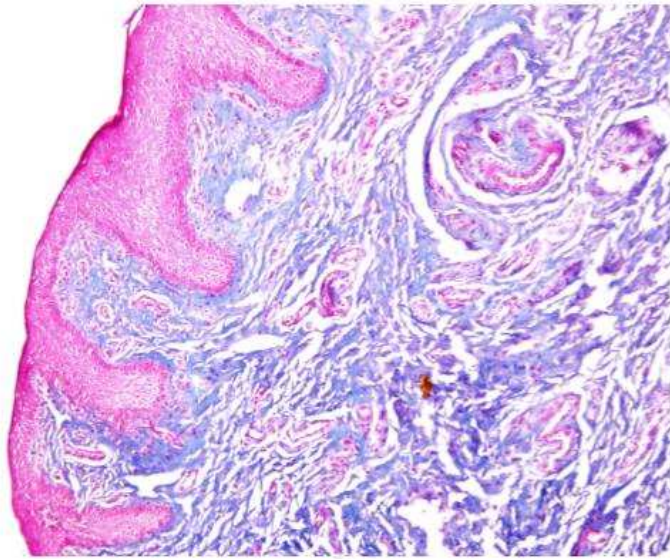
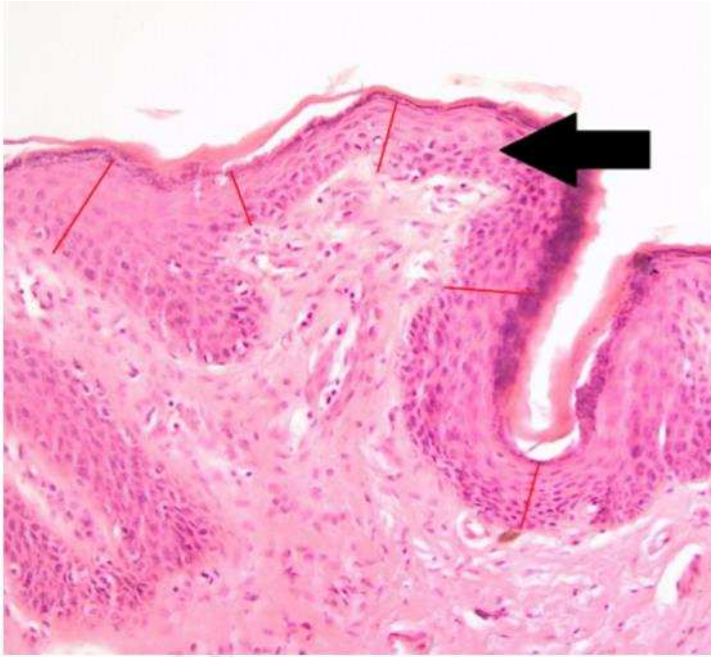
Fig 2. Histochemical examinations of the foreskin with Picrosirius Red staining, 10X.

A: Deposition of dermal collagen (collagen type III in green, type I in red) in Testosterone Group.

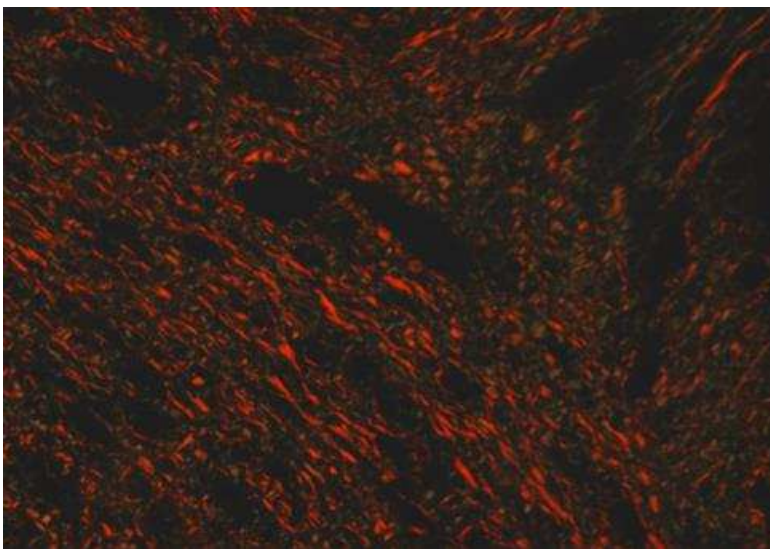
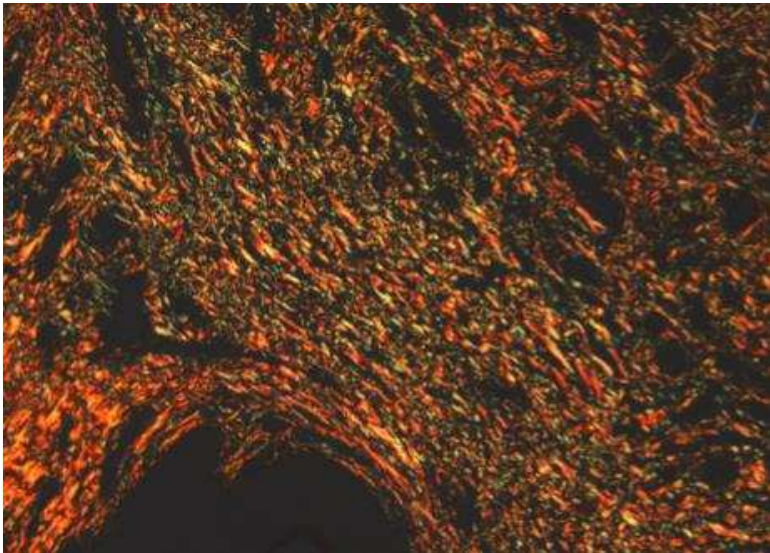
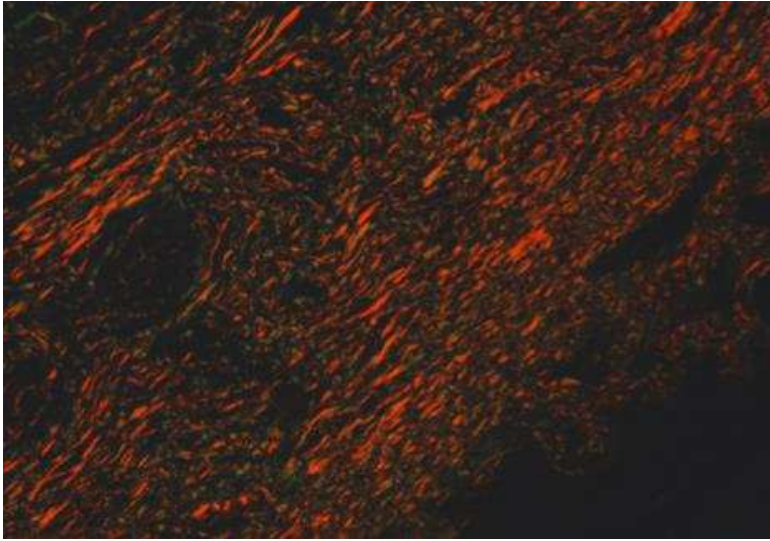
B: Deposition of dermal collagen (collagen type III in green, type I in red) in Estradiol Group.

C: Deposition of dermal collagen (collagen type III in green, type I in red) in Control Group.





ED I



APENDICE 3

ARTICLE IN PRESS

← MODEL



Division of Urology, The Children's Hospital of Philadelphia, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, PA 19104, USA

* Corresponding author.
LongC3@email.chop.edu (C. J. Long)

23 May 2019
Accepted 17 June 2019
Available online xxx

Commentary to 'Topical estradiol increases epidermal thickness and dermal collagen of foreskin prior to hypospadias surgery – randomized double blinded controlled trial'

C.J. Long^a, D.A. Weiss

Hormonal therapy use in hypospadias surgery is not a new concept, with surgeons utilizing it to *tip* (pun intended!) the odds of a successful repair in their favor. Although its use varies per surgeon, pre-operative testosterone is typically given to increase the penile length and glans width in hopes of decreasing tension on the repair [1]. In this study, the authors examine the effects of administering pre-operative topical estradiol to boys with hypospadias. In contrast to testosterone, estradiol does not, and is not intended to, increase penile size [2]. Their goal, however, was not to study the effects on surgical outcomes but instead to understand the histologic changes in epidermal thickness and collagen distribution in the dorsal foreskin. The authors specifically examined the effect of estradiol on the ratio of 'favorable' to 'unfavorable' collagen levels in the foreskin of these boys, with the assumption that this could improve wound healing after surgery as the preputial skin is utilized in most repairs.

An examination of this study must start with identification of its significant flaws. The authors did not include a control group of patients exposed to topical estradiol without hypospadias, which although is a drawback, is an understandable one because of ethical reasons. Their analysis is preliminary in that they did not study other potential effects of estradiol that have been previously demonstrated, including expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) [3]. Finally, although they identified an increase in type I collagen in preputial skin, the ratio of type I (favorable) to type III (unfavorable) collagen is low, consistent with that found in injured tissue. This may suggest a lack of clinical impact of estradiol.

In spite of these limitations, this article begins to think 'outside the androgen box' regarding hypospadias, and, more than being another evaluation of which surgical technique works best in which hands, offers an opening for a new avenue of study. Perhaps, peri-operative topical estradiol will increase the tensile strength of the penile tissue for boys with hypospadias, ultimately improving surgical outcomes. This study is merely the first step in that possible journey, one which should not repeat the same misguided efforts with testosterone, plagued by underpowered studies which have left its use still controversial. Instead, multi-institutional studies, perhaps examining the role of testosterone for increasing penile width and estradiol for wound healing by increasing tensile strength, with sufficient patient numbers and comparative phenotypes, could raise the bar in hypospadias research.

References

- [1] Wong NC, Braga LH. The influence of pre-operative hormonal stimulation on hypospadias repair. *Front Pediatr* 2015;3:31.
- [2] Paiva KC, Bastos AN, Miana LP, Barros ES, Ramos PS, Miranda LM, et al. Biometry of the hypospadias penis after hormone therapy (testosterone and estrogen): a randomized, double-blind controlled trial. *J Pediatr Urol* 2016 Aug; 12(4):200.e1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2016.04.013>. Epub 2016 May 26.
- [3] Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 2003;111(9):1309–18.

<https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2019.06.015>

1477-5131/© 2019 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Long CJ, Weiss DA, Commentary to 'Topical estradiol increases epidermal thickness and dermal collagen of foreskin prior to hypospadias surgery – randomized double blinded controlled trial', *Journal of Pediatric Urology*, <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2019.06.015>

APÊNDICE 5



ANEXO 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação biométrica e morfológica do pênis, prepúcio e miocárdio de crianças portadoras de hipospádia antes e após estímulo hormonal. **Pesquisador:** José Murillo Bastos Netto **Área Temática:**

Versão: 5

CAAE: 33295514.4.0000.5147

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA - UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 983.247

Data da Relatoria:

19/03/2015

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto esta clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está em configuração adequada e há apresentação de declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável da instituição onde será realizada a pesquisa. Apresentou de forma adequada o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa **Conclusões ou Pendências**

e Lista de Inadequações: Diante do exposto, a emenda ao projeto está aprovada, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Dezembro 2015.

Situação do Parecer: Aprovado **Necessita** **Apreciação** **da** **CONEP:** Não

Considerações Finais a critério do CEP: Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO a emenda solicitando alteração do título "Avaliação biométrica e morfológica do pênis e prepúcio de crianças portadoras de hipospádia antes e após estímulo hormonal" para "Avaliação biométrica e morfológica do pênis, prepúcio e miocárdio de crianças portadoras de hipospádia antes e após estímulo hormonal", inclusão da pesquisadora Elisabeth Campos de Andrade, como membro da equipe, e a continuação a linha de pesquisa, que irá comparar outros hormônios e vias de administração usados no pré-operatório da correção de hipospádia, a fim de verificarem qual o mais eficiente. Constatar a ação da testosterona tópica, estradiol tópico e da hCG no crescimento do pênis, e comparar qual dos hormônios e via de aplicação oferece melhores resultados na neoformação vascular e sobre as fibras colágenas e elásticas, ao protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 12 de Março de 2015

Assinado por:
Francis Ricardo dos Reis Justi
(Coordenador)