

MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DAS SOLUÇÕES DE INJEÇÃO PARA DISSECÇÃO ENDOSCÓPICA DE SUBMUCOSA GÁSTRICA

Improved experimental model to evaluate submucosal injection solutions for endoscopic submucosal dissection

Kendi **YAMAZAKI**¹, Fauze **MALUF-FILHO**¹, Vitor Alves Pessoa da **COSTA**¹, Fernanda Cristina Simões **PESSORUSSO**¹, Fabio Yuji **HONDO**¹, Paulo **SAKAI**¹, Luis Francisco Poli de **FIGUEIREDO**² (In Memoriam)

Trabalho realizado no ¹Departamento de Gastroenterologia - Unidade de Endoscopia Gastrointestinal, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, e ²Laboratório Experimental 26, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

DESCRIPTORIOS: Câncer gástrico precoce. Ressecção mucosa endoscópica. Dissecção endoscópica de submucosa.

Correspondência:

Fauze Maluf-Filho
E-mail: fauze.maluf@terra.com.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 22/05/2015
Aceito para publicação: 30/07/2015

HEADINGS - Early gastric cancer. Endoscopic mucosal resection. Endoscopic submucosal dissection.

RESUMO - Racional: Sabe-se que os maiores riscos na ressecção endoscópica da submucosa são o sangramento e a perfuração. A criação de um coxim submucoso duradouro é essencial para a remoção da lesão completa e com segurança. Atualmente não se conhece um modelo experimental adequado para avaliação da durabilidade do coxim submucoso com diferentes soluções. **Objetivo:** Descrever um modelo experimental melhorado para avaliar soluções de injeção de submucosa. **Métodos:** Foram utilizados quatro porcos domésticos para avaliar dois tipos diferentes de soluções para injeção na submucosa gástrica. Após laparotomia mediana, a parede gástrica anterior foi aberta no sentido corpo-antro e sua superfície mucosa foi exposta por eversão da abertura gástrica. Dois tipos diferentes de solução (manitol a 10% e solução salina normal) foram injetados na submucosa da parede gástrica anterior de corpo distal. Todos os coxins submucosos foram injetados até que alcançassem o mesmo tamanho, padronizado como 1,0 cm de altura por 2,0 cm de diâmetro. Foram aplicados régua e compasso para garantir a acurácia das medidas. **Resultados:** O experimento foi completo nos quatro animais. Todos os coxins submucosos tinham o mesmo tamanho, medido com régua e compasso. Com o uso da solução de manitol, a duração média do coxim submucoso foi maior que a da solução salina: 20 e 22 min (média 21 min) vs 5 e 6 min (média 5,5 min). **Conclusões:** Este modelo experimental é simples e permite analisar duração, tamanho e efeito do coxim submucoso, tornando-se mais confiável que outros modelos que empregam estômagos ressecados de porcos ou imagens endoscópicas de modelos porcinos vivos.

ABSTRACT - Background: Endoscopic submucosal dissection carries an increased risk of bleeding and perforation. The creation of a long lasting submucosal cushion is essential for the safe and complete removal of the lesion. There is not a suitable experimental model for evaluation of the durability of the cushioning effect of different solutions. **Aim:** To describe an improved experimental model to evaluate submucosal injection solutions. **Methods:** A total of four domestic pigs were employed to evaluate two different submucosal fluid solutions in the gastric submucosa. After midline laparotomy, the anterior gastric wall was incised from the gastric body to the antrum and its mucosal surface was exposed by flipping inside out the incised gastric wall. Two different solutions (10% mannitol and normal saline) were injected in the submucosa of the anterior wall of the distal gastric body. All submucosal cushions were injected until they reach the same size, standardized as 1.0 cm in height and 2.0 cm in diameter. A caliper and a ruler were employed to guarantee accuracy of the measurements. **Results:** All four animal experiments were completed. All submucosal cushions had the exact same size measured with caliper and a ruler. By using the mannitol solution, the mean duration of the submucosal cushion was longer than the saline solution: 20 and 22 min (mean, 21 min) vs 5 and 6 min (mean, 5.5 min). **Conclusions:** This experimental model is simple and evaluate the duration, size, and effect of the submucosal cushion, making it more reliable than other models that employ resected porcine stomachs or endoscopic images in live porcine models.

INTRODUÇÃO

As técnicas de ressecção endoscópica para o tratamento de câncer gástrico precoce, como mucosectomia endoscópica e dissecção endoscópica de submucosa, são amplamente praticadas no Japão e estão ganhando aceitação em muitos outros países^{6,8}. A introdução destas modalidades endoscópicas levaram a melhorias na qualidade de vida do paciente, sem comprometer as taxas de sobrevivência. Sabe-se, entretanto que a dissecção endoscópica submucosa está relacionada a risco aumentado de hemorragia e perfuração^{10,9}. A criação de um coxim submucoso de longa duração é de extrema importância para a remoção segura e completa da lesão. Na prática clínica, muitos tipos de solução são usados para este propósito. Entre os agentes atualmente disponíveis, ácido hialurônico, glicerol, hidroxipropilmetilcelulose são os que parecem ter um efeito de elevação mais duradouro^{12,3,13,2}.

Estudos experimentais em modelos animais descrevem os benefícios de cada solução¹⁴. A maior parte destes experimentos são estudos *ex vivo* realizados com estômago porcino. Em nossa opinião, este não é um modelo adequado para avaliação da durabilidade do efeito de elevação, uma vez que o fluxo vascular é comprometido

em modelos *ex vivo*. Por outro lado, a avaliação endoscópica do coxim submucoso em modelos de suíno vivo tem o viés de medidas obtidas por imagens endoscópicas bidimensionais e ampliadas^{2,4,1}.

O objetivo deste estudo foi descrever um modelo experimental melhorado para avaliar soluções de injeção na submucosa em modelo suíno vivo.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em jejum durante aproximadamente 12 horas antes do procedimento e foram submetidos à anestesia geral com intubação endotraqueal. Foram utilizados quatro porcos domésticos (50 kg) para avaliar duas soluções de fluidos diferentes na submucosa gástrica. A preparação da pele foi primeiramente realizada com detergente antisséptico, seguida da aplicação de solução antisséptica, gluconato de clorexidina a 4%.

Foi efetuada incisão abdominal mediana para abordar a cavidade abdominal e o estômago. A parede gástrica anterior foi incisada a partir do corpo para o antro gástrico e a sua superfície mucosa foi exposta através da eversão, ou rotação da parede gástrica aberta (Figura 1). Durante este procedimento, os vasos gástricos principais, tais como as artérias gástricas esquerda e direita e artérias gastroepiplóicas esquerda e direita, não foram comprometidos.

Em todos os quatro animais foram injetadas duas soluções diferentes na submucosa da parede anterior do corpo gástrico distal. A primeira foi uma combinação de 100 ml de manitol a 20%, 100 ml de solução salina normal, e 2,0 ml de corante índigo carmin a 4%. A segunda foi realizada num local separado, 5 cm distais da primeira injeção, empregando-se uma mistura de 100 ml de solução salina normal com 2,0 ml de corante índigo carmin a 4%. A técnica de injeção foi a mesma para ambas as soluções. Usando uma seringa de 10 mL cheia com a solução e conectada a uma agulha de escleroterapia 23 gauge (Boston Scientific, São Paulo, Brasil), 2,0 ml da solução foi injetada entre as camadas mucosa e submucosa (Figura 2). Se a mucosa não se elevasse após uma injeção de 0,5 ml, a agulha era reinserida repetidamente em diferentes ângulos até uma elevação mucosa visível. Todos os coxins submucosos foram injetados até atingirem o mesmo tamanho, padronizados neste estudo, em 1,0 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro (Figura 3). Um compasso e uma régua foram empregados para garantir a precisão das aferições (Figura 4). O tempo para o desaparecimento do coxim foi marcado de forma padronizada usando um cronômetro que foi iniciado imediatamente após a conclusão da injeção submucosa. Os resultados foram expressos em minutos.

Depois do desaparecimento completo do coxim, a área de incisão do estômago foi suturada e a parede abdominal foi fechada com pontos separados de poliglactina 2-0. Todos os animais foram mantidos vivos durante 6 h e eutanasiados.

Não foi calculado o tamanho da amostra, uma vez que o objetivo principal foi descrever o modelo experimental melhorado e apresentar o tempo necessário para o achatamento do coxim criado com ambas as soluções em quatro animais e expressar esses números em minutos.

RESULTADOS

O experimento foi concluído nos quatro animais. Todos os coxins submucosos possuíam exatamente o mesmo tamanho, medida com compasso e régua. Quando utilizada a solução de manitol, a duração média da elevação submucosa foi maior do que a solução salina: 20 e 22 minutos (média de 21 minutos) vs 5 e 6 min (média de 5,5 min) (Figura 5). Os resultados estão detalhados na Tabela 1.

TABELA 1 – Tempo decorrido até planificação do coxim submucoso

	Animal 1		Animal 2		Animal 3		Animal 4	
	Manitol	Salina	Manitol	Salina	Manitol	Salina	Manitol	Salina
Duração (min)	22	5	22	6	20	6	20	5

DISCUSSÃO

Vários modelos experimentais podem ser aplicados na avaliação da duração do efeito de elevação com diferentes soluções injetadas na camada submucosa da parede gástrica. A alta viscoelasticidade parece ser uma propriedade importante para uma boa elevação da submucosa por fluido. A viscoelasticidade associa as qualidades de viscosidade (resistência ao fluxo de cisalhamento quando a tensão é aplicada) e a elasticidade (estiramento quando tensionada e retorno ao estado original uma vez que a tensão é removida).⁵

Usando seis diferentes soluções como agentes de injeção em suínos vivos, Giday et al. compararam o desempenho e a duração da elevação da mucosa por endoscopia, mostrando resultados diferentes com cada tipo de agente⁴. Empregando o mesmo modelo, Conio et al. confrontaram solução salina normal, solução salina normal mais solução de epinefrina, dextrose a 50%, glicerina a 10%/frutose a 5% e ácido hialurônico a 1% para a criação de uma bolha na submucosa do esôfago distal¹. Ambos os estudos se basearam na visão endoscópica da bolha achatada para determinar a duração do efeito de amortecimento da solução injetada. Acredita-se que a imagem bidimensional criada pelo endoscópio pode ser imperfeita quando a intenção é avaliar a duração do coxim de submucoso, uma vez que a acurácia da visão endoscópica é reduzida quanto a proporções e se deseja avaliar coxins do mesmo tamanho para este tipo de comparação. Outros estudos usaram estômagos de suíno sacrificados para avaliar o mesmo intento⁷. A metodologia utilizada nestes estudos consiste em injetar a mesma quantidade de solução para na camada submucosa, medindo o tamanho do coxim (em modelos *ex vivo*), e registrar o tempo de seu desaparecimento. Usando espécimes de cólon humano recém ressecados, Sumiyoshi et al. compararam glicerol com solução salina normal, com observação lateral da elevação na submucosa e aferida 1,3,5,7, e 10 minutos após a injeção¹¹. O grupo glicerol manteve uma elevação da submucosa significativamente mais duradoura. Recentemente, Yoshida et al., utilizaram um método semelhante, contudo com cólon e esôfago porcinos ressecados em segmentos de 10 cm de diâmetro, para examinar a duração do coxim submucoso usando ácido hialurônico e solução salina normal¹⁵.

Os modelos citados partilham a mesma limitação de todos os modelos *ex vivo*: não há vascularização no tecido, o que definitivamente compromete as pressões hidrostática e osmótica que regulam a distribuição tecidual da solução. Em um estudo comparando diferentes soluções, Polymeros et al. utilizaram modelos suínos *ex vivo* nas primeiras horas após a morte dos animais, a fim de evitar alterações teciduais significativas; no entanto, este esforço não aborda a questão da vascularização⁷.

O modelo aqui proposto elimina a maioria das limitações de outros modelos experimentais. No entanto, na situação clínica de ressecção submucosa endoscópica, o estômago está completamente distendido por ar e é discutível se a pressão intragástrica poderia exercer uma pressão expressiva e causar qualquer efeito sobre o tamanho ou a duração da elevação submucosa. Esta poderia ser uma limitação significativa deste modelo.

Independentemente de qual solução submucosa foi empregada, o objetivo principal deste estudo foi comprovar

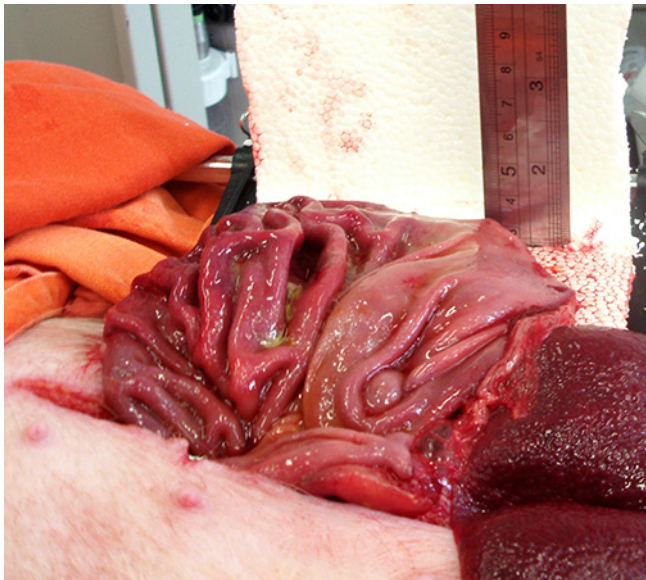


FIGURA 1 – Visão da peça aberta e régua posicionada verticalmente para medir a elevação do coxim submucoso

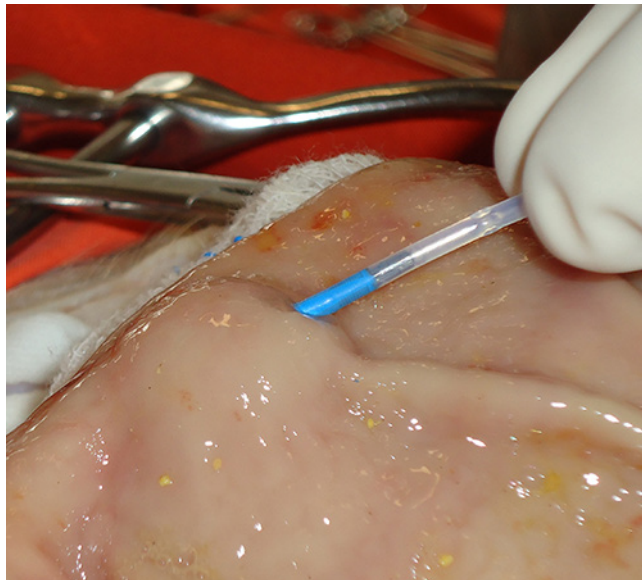


FIGURA 2 – Criação do coxim submucoso



FIGURA 3 – Visão dos doiscoxins submucosos criados por injeção de solução de manitol a 10% (seta preta) e solução salina (seta branca)

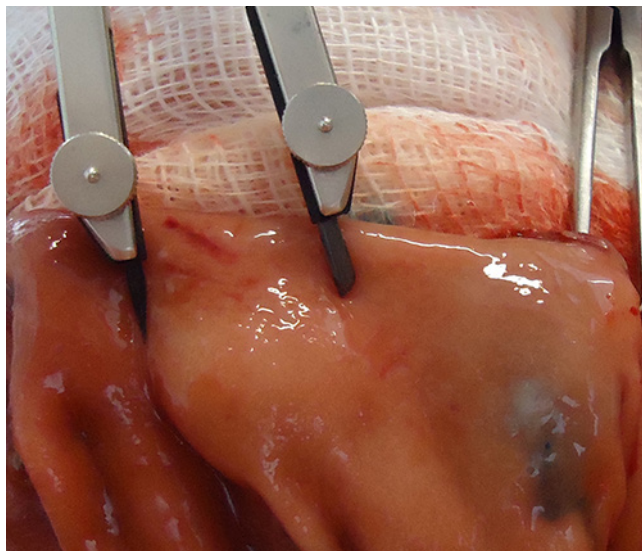


FIGURA 4 – Aferição do diâmetro do coxim com compasso

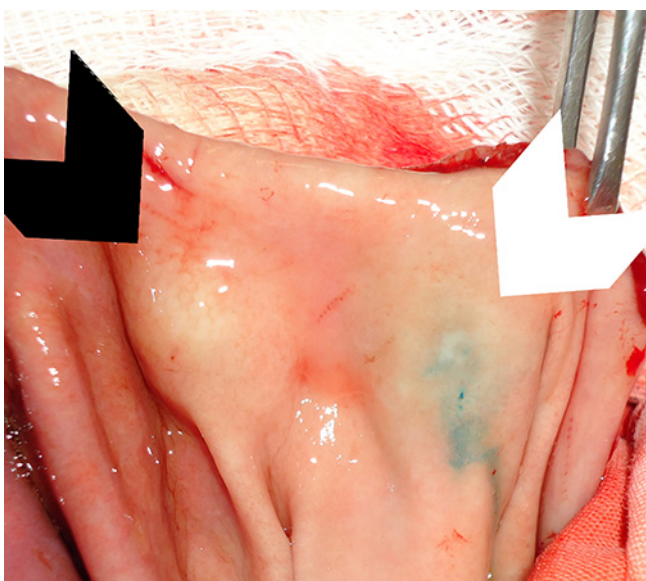


FIGURA 5 – O coxim da esquerda (manitol) se mantém elevado enquanto o coxim de solução salina está quase plano

a viabilidade do modelo proposto. Na verdade, as diferenças esperadas obtidas com as diferentes soluções atestam a fiabilidade do modelo.

Reconhecemos que estes resultados não diferem significativamente de outros estudos. Contra argumentamos, porém, com a necessidade de um modelo melhorado para avaliar soluções de injeção submucosa para dissecação endoscópica da submucosa. Nosso modelo é robusto na maneira em que ele aborda a maioria das limitações inerentes de outros modelos: visão direta e mensuração do coxim submucoso, bem como a preservação das estruturas vasculares. Este pode ainda guiar conceito para a avaliação de soluções futuras.

CONCLUSÃO

Este modelo experimental para avaliar soluções de injeção submucosa em modelos de suíno vivo é simples e permitiu avaliar a duração, tamanho e efeito do coxim submucoso, tornando-o mais confiável do que os outros modelos que empregam estômagos suínos ressecados ou imagens endoscópicas em modelos suínos vivos.

REFERÊNCIAS

1. Conio M, Rajan E, Sobi D, Norton I, Herman L, Filiberti R, Gostout CJ Comparative performance in the porcine esophagus of different solutions used for submucosal injection. *Gastrointestinal Endosc.* 2002;56:513-6.
2. Feitoza AB, Gostout CJ, Burgart LJ. Hydroxypropyl methylcellulose: a better submucosal fluid cushion for endoscopic mucosal resection. *Gastroint Endosc.* 2003; 57:41-7.
3. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, Mizushima Y, Oka M, Enomoto S, et al. Comparison of various submucosal injection solutions for maintaining mucosal elevation during endoscopic mucosal resection. *Endoscopy.* 2004;36:579-83.
4. Giday SA, Magno P, Buscaglia JM, Canto MI, Ko CW, Shin EJ, et al. Is blood the ideal submucosal cushioning agent? A comparative study in a porcine model. *Endoscopy.* 2006;38:1230-4.
5. Meyers MA, Chawla KA. Viscoelasticity. IN: Meyers, Chawla KA, editors. *Mechanical behavior of materials.* Upper Saddle River (NJ): Prentice Hall;1999.p.98-103.
6. Ono H, Kondo H, Gotoda T, Shirao K, Yamaguchi H, Saito D, et al. Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. *Gut.* 2001;48:225-9.
7. Polymeros D, Kotsalidis G, Triantafyllou K, Karamanolis G, Panagiotides JG, Ladas SD. Comparative performance of novel solutions for submucosal injection in porcine stomachs: An ex vivo study. *Digestive and Liver Disease.* 2006;42: 226-9.
8. Rosch T, Sarbia M, Schumacher B, Deinert K, Frimberger E, Toerner T, et al. Attempted endoscopic en bloc resection of mucosal and submucosal tumors using insulated-tip knives: a pilot series. *Endoscopy.* 2004;36:788-801.
9. Soetikno R, Gotoda T, Nakanishi Y, Soehendra N. Endoscopic mucosal resection. *Gastrointestinal Endosc.* 2003;57: 567-79.
10. Soetikno RM, Inoue H, Chang KJ. Endoscopic mucosal resection. Current concepts. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2000;10:595-617.
11. Sumiyoshi T, Fujii T, Sumiyoshi Y. Injected substances to the submucosa in endoscopic mucosal resection: glycerin solution versus normal saline solution. *Gastrointest Endosc.* 2002;55:AB110.
12. Uraoka T, Fujii T, Saito Y, Sumiyoshi T, Emura F, Bhandari T, et al. Effectiveness of glycerol as a submucosal injection for EMR. *Gastrointest Endosc.* 2005;61:736-40.
13. Yamamoto H, Yube T, Isoda N, Sato Y. A novel method of endoscopic mucosal resection using Sodium Hyaluronate. *Gastrointest Endosc.* 1999;50:251-6.
14. Yamasaki M, Kume K, Yoshikawa I, Otsuki M. A novel method of endoscopic submucosal dissection with blunt abrasion by submucosal injection of sodium carboxymethylcellulose: an animal preliminary study. *Gastroint Endosc.* 2006;64:958-65.
15. Yoshida N, Naito Y, Kugai M, Inoue K, Uchiyama K. Efficacy of hyaluronic acid in endoscopic mucosal resection of colorectal tumors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2011;26:286-91.