



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EFICACIA DE UNA MATRIZ DE GELATINA ABSORBIBLE EN LA  
CREACIÓN DE UN COLCHÓN SUBMUCOSO PARA LA  
RESECCIÓN DE MUCOSA GÁSTRICA

~~XXXXXXXXXX~~ TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

JACOBO VELÁZQUEZ AVIÑA

TUTOR: ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE SÍMBOLOS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
RESUMEN	VI
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Epidemiología del cáncer gástrico	1
1.2 Clasificación macroscópica de tumores del tubo digestivo	1
1.3 Técnicas endoscópicas: REM / DES	1
1.4 Colchón submucoso	3
1.5 Hemostáticos	4
1.6 Gelatina	5
1.6.1 <i>Métodos de extracción</i>	5
1.6.2 <i>Composición y estructura química del colágeno</i>	6
1.6.3 <i>Composición química de la gelatina</i>	7
1.6.4 <i>Estructura química de la gelatina</i>	8
1.6.5 <i>Características físicas de la gelatina</i>	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
5. HIPÓTESIS	13
6. OBJETIVOS	14
6.1 Objetivo general	14
6.2 Objetivos específicos	14
7. Metodología	15
7.1 Tipo de estudio	15
7.2 Población	15
7.3 Criterios de inclusión	15
7.4 Criterios de exclusión	15
7.5 Criterios de eliminación	15
7.6 Cálculo del tamaño de la muestra	16
7.7 Definición de variables	17
7.8 Análisis estadístico	19
7.9 Procedimiento	20
7.9.1 <i>Preparación de la matriz de gelatina</i>	20
7.9.2 <i>Aplicación de la matriz de gelatina en modelo ex vivo</i>	20
7.9.3 <i>Modelo murino</i>	21
7.9.4 <i>Modelo porcino</i>	23

8. Resultados	25
8.1 Modelo murino	25
8.1.1 <i>Tiempo y volumen de los colchones submucosos</i>	25
8.1.2 <i>Hemostasia post resección</i>	28
8.1.3 <i>Efecto disector</i>	28
8.1.4 <i>Integridad de tunicas de la pared gástrica</i>	30
8.1.5 <i>Respuesta inflamatoria</i>	30
8.2 Modelo porcino	31
8.2.1 <i>Tiempo y volumen de los colchones submucosos</i>	31
8.2.2 <i>Hemostasia post resección</i>	34
8.2.3 <i>Efecto disector</i>	36
8.2.4 <i>Integridad de tunicas de la pared gástrica</i>	37
8.2.5 <i>Respuesta inflamatoria</i>	37
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
11. PERSPECTIVAS	43
12. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	44
13. BIBLIOGRAFÍA	45

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación macroscópica de las lesiones del tracto digestivo tipo 0, con apariencia superficial por vía endoscópica. ....	1
2	Composición de aminoácidos de la gelatina de obtenida de piel porcina. ....	8
3	Comparación del tiempo y volumen de los colchones submucosos en el modelo murino. ....	25
4	Tabla de contingencia para hemorragia post resección de mucosa, modelo murino. ....	28
5	Tabla de contingencia para el efecto disector, modelo murino .....	28
6	Comparación del tiempo y volumen de los colchones submucosos en el modelo porcino. ....	31
7	Tabla de contingencia para hemorragia, modelo porcino.....	34
8	Tabla de contingencia para el efecto disector, modelo porcino.....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Composición y estructura del colágeno: Hélice $\alpha$ , conformada por repetición en tándem predominantemente de glicina, prolina e hidroxiprolina. Triple hélice, conformada por 3 cadenas $\alpha$ . Fibra de colágeno, conformada por múltiples triples hélices.....	7
2	Diferentes tipos de organización de las cadenas de gelatina.....	8
3	Inyección de la gelatina en modelo <i>ex vivo</i> .....	20
4	Labor de cada uno de los 3 investigadores durante la fase experimental animal.....	21
5	Creación del colchón submucoso gástrico en modelo murino.....	22
6	Creación del colchón submucoso gástrico en modelo porcino.....	24
7	Gráfica de caja y bigotes para el volumen inicial de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina, modelo murino.....	26
8	Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 10 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.....	26
9	Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 20 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina, modelo murino.....	27
10	Gráfica comparativa que muestra el volumen del colchón submucoso con ambas sustancias a lo largo del tiempo en el modelo murino.....	27
11	Biopsia de estómago de rata que ejemplifica el colchón submucoso con 1 ml de gelatina.....	29

12	Corte histológico de un colchón creado con 1 ml de gelatina en un estómago de rata a los 10 minutos de haber sido inyectado, teñido con técnica de Masson que ejemplifica la expansión de la túnica submucosa y la división de la misma hacia la mucosa y la muscular propia.....	29
13	Corte histológico de un colchón creado con 3 ml de gelatina en el estómago del puerco a los 5 min de haber sido inyectado, que ejemplifica la integridad epitelial, ausencia de edema en la lámina propia y de leucocitos por encima de la membrana basal.....	30
14	Gráfica de caja y bigotes para el volumen inicial de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina, modelo porcino.....	32
15	Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 10 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina, modelo porcino.....	32
16	Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 20 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina, modelo porcino.....	33
17	Gráfica comparativa que muestra el volumen del colchón submucoso con ambas sustancias a lo largo del tiempo en el modelo porcino.....	33
18	Colchones submucosos creados con gelatina, la cual envuelve los eritrocitos aislándolos de la muscularis mucosae.....	35
19	Gelatina en la túnica submucosa envolviendo eritrocitos.....	36

## LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
cc	Centímetros cúbicos
CS	Colchón submucoso
DES	Disección endoscópica de la submucosa
Ec	Compresión modular
G	Gelatina
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
Kg	Kilogramos
kPa	Kilo pascales
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
M. mucosae	Muscularis mucosae
NaCl	Cloruro de sodio
REM	Resección endoscópica de la mucosa
SS+E	Solución salina 0.9% + epinefrina 1/10 000



## AGRADECIMIENTOS

Al hacer el recuento de lo vivido para realizar esta tesis, me vienen a la mente un sinnúmero de personas sin las cuales no hubiera sido posible su realización, pues cada una de ellas, contribuyeron sabiéndolo o no, a su elaboración. Por ello quiero decirle a cada uno de ustedes que no importa el orden en el que a continuación los mencione, siéntanse en el primerísimo lugar, porque para mí ese lugar ocupan en mi corazón.

Gracias Mami, gracias Papi por apoyarme en todo momento, por estar siempre aquí, conmigo, por haber sembrado en mí desde pequeño la semilla de la responsabilidad y el trabajo, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación, por sus oraciones, pero sobre todo, por el excelente ejemplo de vida que siempre han sido. Ustedes son todo para mí, los amo.

Gracias Armando, Gerardo, Beba, Mich, Betty, Julian por formar parte de mi vida, por sus cuidados y preocupaciones, por confiar siempre en mí, por llenar mi vida de alegría y amor cuando más lo he necesitado, por sus sabios consejos, por enseñarme a buscar siempre el diez y a ser mejor en todo lo que haga. ¡¡¡Los mega quiero!!!

Gracias a Fer, Lucy y Gery por ser parte de la familia y por alegrar y darle sentido a la vida de Gigo, porque al hecerlo, le dan alegría y sentido a la de toda la familia.

Santi, mi Santi querido. Gracias por haber escogido llegar a esta familia, por enseñarme a ver la vida con otra mirada, por el esfuerzo que haces día a día. ¡¡Eres mi campeón!! Tú eres el pegamento de la familia. ¡¡¡Te adoro mi niño hermoso!!!

Dieguito, gracias por ser la alegría de la familia; cada año te esperamos con ansias. Te quiero mucho, mi Heráclito!!!

Agradezco a mi tutor, el Dr. Andrés Castell Rodríguez, por haber confiado en mí, por haber compartido sus conocimientos, pero sobre todo por su amistad.

Gracias a la histotecnóloga Raquel Guerrero Alquicira, por su espléndido trabajo y gran profesionalismo.

Gracias Mike por recibirme en el laboratorio, por tu paciencia, tus enseñanzas y por estar siempre allí ofreciéndome tu ayuda.

Gracias Gaby, Betty, Katia por sus sonrisas y enseñanzas en el mundo del laboratorio.

Vane, sabes muy bien que fuiste clave en esta maestría. Gracias por todo, por siempre confiar en mí, por escucharme, por tus consejos, por tus enseñanzas, por tu amistad... y por las pizzas.

Por último, agradezco a las licenciadas Angelito, Magno y Ale por su infinita paciencia y apoyo.

*Porque ahora entiendo que  
buscando la Verdad  
realmente te busco a ti, Dios mío;  
y buscándote a ti,  
realmente busco la Verdad.*

*Esta tesis está dedicada a ti  
por quien vivo, me muevo y existo.*

## RESUMEN.

Una lesión neoplásica superficial es definida cuando la apariencia endoscópica sugiere que la invasión está limitada a la mucosa o submucosa y es susceptible de extirpación con fines curativos. En la actualidad, la resección de la mucosa afectada por vía endoscópica es el tratamiento estándar. Para lo cual es necesario crear colchón submucoso (CS) que separe las tunicas profundas de la pared gástrica antes de ser resecada la lesión para disminuir el riesgo de hemorragia y perforación. No existe, hasta el momento, la substancia ideal que mantenga un volumen consistente, duradero, que sea hemostático y que cause nulo o ningún daño a los tejidos adyacentes a la lesión. La gelatina es una substancia con propiedades químicas y físicas que pueden ser aprovechadas para este fin.

*Objetivo.* Evaluar la eficacia de una gelatina (G) para crear un CS en la resección de la mucosa gástrica.

*Material y método.* Diseño experimental. Dos etapas: modelo murino y porcino. Dos grupos aleatorios: A: Gelatina. Grupo B: solución salina-epinefrina (SS+E). Se inyectaron en la submucosa del estómago. Se midió el volumen cada 10 minutos hasta los 75min. Se realizó mucosectomía y se evaluó la hemorragia. Se realizó estudio histológico que evaluó daño a tunicas adyacentes y efecto disector.

*Resultados.* Modelo murino: 6 observaciones. Tiempo promedio del CS: SS+E 4.38 vs >75 minutos gelatina. Volumen (mm<sup>3</sup>) inicial con SS+E 914 vs 1,494 gelatina. A los 10 minutos: 55.73 vs 1,456. Modelo porcino: 8 observaciones. Tiempo promedio del CS: SS+E 9.1 vs > 75 minutos gelatina. Volumen inicial: SS+E 6,591 vs 12,963 gelatina; a los 10 minutos 630 vs 12,538. Hemorragia: 1 con gelatina vs 7 con SS+E. Efecto disector 7 con gelatina vs 0 con SS+E. No hubo daño en capas adyacentes ni respuesta inflamatoria.

*Conclusiones.* Los CS de gelatina permanecieron más tiempo, con efecto hemostático y disector que los creados con SS+E. No hubo diferencia entre los dos grupos en cuanto al daño a tunicas adyacentes ni respuesta inflamatoria local

## ANTECEDENTES.

De acuerdo al último reporte del GloboCan 2012, se estimó cerca de un millón de nuevos casos de cáncer gástrico en 2012 (952,000 casos), siendo la quinta causa más frecuente de malignidad en el mundo, después del de pulmón, mama, colo-recto y próstata. Más del 70% de casos ocurrieron en países desarrollados. La incidencia es dos veces mayor en hombres que en mujeres y ha sido considerada la tercera causa de muerte por cáncer en ambos sexos a nivel mundial. En México, ocupó el sexto lugar en incidencia y el quinto en mortalidad por cáncer [1].

La clasificación macroscópica de tumores del tubo digestivo los agrupa en lesiones superficiales (tipo 0) y lesiones avanzadas (del 1 al 5). Agregando dos apartados a la antigua clasificación de Borrmann: el tipo 0 que son las lesiones superficiales o incipientes y las lesiones tipo 5 que es el carcinoma avanzado inclasificable.

Una lesión neoplásica superficial es definida cuando la apariencia endoscópica sugiere que la invasión está limitada a la mucosa o submucosa y es susceptible de extirpación con fines curativos. [2] Las lesiones superficiales se subclasifican a su vez en tres tipos. [Cuadro 1]

<b>Protruidas</b>	
<b>Pedunculada</b>	0 – Ip
<b>Sésil</b>	0 – Is
<b>No protruida y no excavada</b>	
<b>Ligeramente elevada</b>	0 – Ila
<b>Completamente plana</b>	0 – I Ib
<b>Ligeramente excavada</b>	0 – I Ic
<b>Excavada</b>	
<b>Úlcera</b>	0 - III

En la actualidad, las dos técnicas endoscópicas aceptadas para tratar las lesiones adenomatosas gastrointestinales y neoplásicas superficiales del tracto digestivo son la resección endoscópica de la mucosa (REM) y la disección endoscópica de la submucosa (DES). Ambas técnicas superiores a la simple biopsia en el diagnóstico y estadificación de las neoplasias. El objetivo de ambas técnicas es la resección R0 de la lesión (márgenes libres de tumor). [3,4]

La REM pretende eliminar por completo el área de mucosa afectada mediante la escisión de la submucosa de la pared intestinal. Las cuatro técnicas de REM comúnmente utilizadas son: 1. Método de inyección y corte. [5-7] 2. Método de inyección, elevación y corte. [8-9] Método asistido con capuchón. [10-11] 4. Método empleando ligadura. [12] Esencialmente la técnica consiste en levantar el área de mucosa enferma de la capa muscular mediante la creación de un colchón submucoso, el cual es capturado y estrangulado utilizando un asa electroquirúrgica y a continuación resecado. Sin embargo, la inyección en la fina capa submucosa es un proceso delicado, ya que la solución inyectada tiende a difundirse rápidamente y las lesiones planas y deprimidas son difíciles de capturar con la trampa (asa) en comparación con las lesiones protruidas. Las desventajas de la REM, por lo tanto, son a menudo resultado de resecciones parciales, sobre todo en los casos de lesiones grandes o de difícil acceso, dando lugar a una evaluación histológica incorrecta de la profundidad y extensión neoplásica e incrementando la posibilidad de recidiva local. En consecuencia, las resecciones en bloque utilizando este procedimiento se sugiere que sean lesiones de aproximadamente 15 a 20 mm de diámetro. [11-15]

Por su parte, la DES se basa en la identificación clara y marcaje de los márgenes de la lesión neoplásica, la inyección submucosa de una sustancia que eleve el área de mucosa afectada, el aislamiento de la lesión neoplásica del tejido sano circundante mediante un corte circunferencial delineando macroscópicamente bordes sin lesión y la exéresis de la lesión mediante la disección de la túnica submucosa utilizando un bisturí electroquirúrgico endoscópico. Esta técnica se emplea generalmente para lesiones de mayor tamaño. [16-21]

Existen diferencias significativas entre las técnicas de REM y DES. El porcentaje de resección en bloque de la DES es del 92% contra 52% de la REM. En cuanto al porcentaje de resección completa la DES presenta un 92% vs un 47% de la REM. En resección curativa la DES presenta un 79% vs un 59% de la REM. Así, el porcentaje de recurrencia de tumores en la DES es del 1% vs 5% en la REM. Sin embargo, como es de esperar, al requerir mayor destreza técnica, la DES presenta una mayor tasa de complicaciones, de manera principal hemorragia y perforación (4.5%) comparada a la REM que es del 1%. [22]

## **Colchón submucoso.**

El principio fundamental de la inyección submucosa es la elevación del área de la mucosa donde se asienta la lesión neoplásica y la separación de las tunicas profundas de la pared del tracto gastrointestinal antes de ser resecada la lesión, esto con la finalidad de disminuir el riesgo de dos de las principales complicaciones de estos procedimientos: hemorragia y perforación. La primera, con una incidencia que puede oscilar del 1.7 a 20%. [3] El principal factor implicado en la hemorragia es la dificultad para visualizar claramente el plano de disección submucoso y por ende, los vasos sanguíneos localizados allí. Por su parte, la perforación se presenta entre un 1 a un 5% dependiendo de la técnica empleada. La perforación se puede presentar de manera inmediata o tardía. La primera, se presenta transprocedimiento y es debida a un deficiente colchón submucoso que no logra elevar la túnica mucosa ni separarla de las tunicas adyacentes, con lo cual sobreviene la perforación al momento del corte. La segunda, se presenta generalmente dentro de la primera semana posterior al procedimiento y es causada por isquemia de la pared como consecuencia de un excesivo uso del efecto de coagulación del electrobisturí sobre los vasos sangrantes durante el procedimiento al no visualizarlos por la escasa o nula separación de las tunicas de la pared. [2-6]

Desde la primera descripción en 1950 de una inyección submucosa para facilitar una polipectomía endoscópica, múltiples intentos se han realizado para encontrar el agente ideal, el cual debe ser barato, de fácil disponibilidad, con viscosidad óptima y que proporcione un colchón duradero pero con mínimo o nulo daño a los tejidos circundantes del sitio de la inyección. Diversos autores han demostrado el uso del ácido hialurónico, de la hidroxipropilmetilcelulosa, glicerol, solución dextrosa, solución salina, solución salina con epinefrina, albumina en diversas concentraciones, alginato de sodio y sangre autóloga. [23-28]. Los inconvenientes de estos agentes es que son caros, difíciles de preparar, almacenar o inyectar. [23,27,28] Un factor en contra adicional, que desaconseja el uso del ácido hialurónico, por ejemplo, es su capacidad para estimular el crecimiento tumoral, demostrado tanto en estudio *in vivo* como *in vitro*. [29,30] y la preocupación con el uso de la hidroxipropil metilcelulosa es que causa una reacción inflamatoria local y a dosis altas, una reacción antigénica. [28,31]

La osmolaridad de las diversas sustancias es otro determinante significativo en las propiedades de las soluciones inyectadas. Un ejemplo de ello son las soluciones hipertónicas (NaCl 3.75% y dextrosa al 20%) las cuales causan un daño significativo a los tejidos adyacentes. [32,33] En cuanto al empleo de sangre autóloga existen algunos estudios que reportan los pros

y contra de su empleo. Siendo los primeros, la duración del colchón, la disponibilidad y su relativo bajo costo. Y sus desventajas, los pocos estudios en seres humanos que lo han evaluado, su dificultad para la inyección y la poca visibilidad de la túnica submucosa a la hora de la disección. [34-36]

Actualmente la solución salina es el agente usado más popular durante la REM y la DES, ya sea sola o agregando epinefrina 1/10 000 para conseguir vasoconstricción local. Sin embargo, el mayor problema de su empleo es su rápida absorción y difusión en los tejidos adyacentes al sitio de la inyección, obligando al endoscopista a múltiples inyecciones durante el procedimiento quirúrgico para mantener una elevación efectiva. Este problema incrementa el tiempo del procedimiento y consecuentemente los riesgos debidos al cansancio del endoscopista y del mayor tiempo de anestesia. Recientemente se publicó un trabajo que reporta la presencia de edema e hiperemia local tras el empleo de la solución salina, lo que origina un retraso en la cicatrización e incrementa el riesgo de sangrado postprocedimiento. [36]

En cirugía existen herramientas que incrementan la efectividad hemostática durante el sangrado capilar o en capa cuando el uso de ligaduras u otros métodos convencionales son difíciles o inefectivos. Estos hemostáticos son divididos de manera general en agentes activos y pasivos. Los primeros (fibrina y trombina) actúan al final de la cascada de la coagulación formando un coágulo de fibrina, y los últimos (colágena, gelatina, celulosa oxidada regenerada) tienen un efecto mecánico favoreciendo la agregación plaquetaria. [37-39]

Un hemostático tópico pasivo es la gelatina. Hay registros del empleo de este producto desde la antigüedad. Existen reportes de su uso como pegamento desde 6000 años a.C. Con el tiempo su fabricación se fue industrializando y sus aplicaciones se han incrementado. Actualmente es utilizada en las industrias de alimentos, fotográficos y farmacéutica. Las principales fuentes de producción de la gelatina son la piel del cerdo (46%), cuero bovino (29.4%), hueso de puerco y ganado (23.1%) y del pescado (1.5%). [40]

## **Métodos de extracción de la gelatina.**

Este biopolímero se compone en un 85-92% de proteína, 1-2% sales minerales y el resto de agua. Es producido por una hidrólisis parcial del colágeno. Dependiendo de la materia prima utilizada, el colágeno no tiene la misma estructura, composición y propiedades, de hecho, se han identificado 28 tipos diferentes de colágeno. La formación reticular del colágeno depende de varios factores. Uno de ellos es la edad de los animales. En animales jóvenes las moléculas de colágeno presentan pocos enlaces cruzados (reticulación), lo cual proporciona la elasticidad a su piel. Pero con el envejecimiento se van obteniendo más enlaces cruzados en la red de colágeno, creando una estructura extremadamente estable. El proceso de obtención de la gelatina está influenciado totalmente por el grado de reticulación, ya que el objetivo en la obtención del colágeno es la escisión de los enlaces cruzados para conseguir una estructura desnaturalizada. Por último, cabe mencionar que existen muchas otras moléculas en la piel de cerdo y que a pesar del pretratamiento y de la extracción térmica, el extracto puede contener no sólo los colágenos desnaturalizados sino también otros componentes de la matriz extracelular, tales como proteoglicanos, elastina o fibronectina que se interrelacionan con el colágeno en el tejido conectivo. [40-42]

Existen cuatro métodos utilizados para obtener gelatina, siendo las más utilizadas en la actualidad el método ácido y el método básico: [40,41]

- **Extracción ácida.** Es el método más rápido, se aplica a materia prima con poco grado de entrecruzamiento, por ello se utiliza más en las pieles de cerdo, obteniéndose una gelatina denominada A (Ácida).
- **Extracción enzimática.** Este método se encuentra en investigación, para ello se ha empleado la enzima pronasa en presencia de cloruro de calcio, el tiempo necesario es menor al método ácido.
- **Extracción microbiana.** Se han tratado pieles con mycoderma y torulopsis y se ha obtenido gelatina en 21 días. Ésta técnica y la enzimática son relativamente nuevas.
- **Extracción alcalina.** Es el método más lento y se utiliza frecuentemente tiempos que van de tres a cinco meses a temperaturas menores a 20°C, éste método se aplica de preferencia a materiales con alto grado de entrecruzamiento tales como las pieles de bobinos y búfalos. En este proceso, el colágeno es desorganizado en su estructura fibrilar y solo el calentamiento en medio acuoso sin acción química complementaria



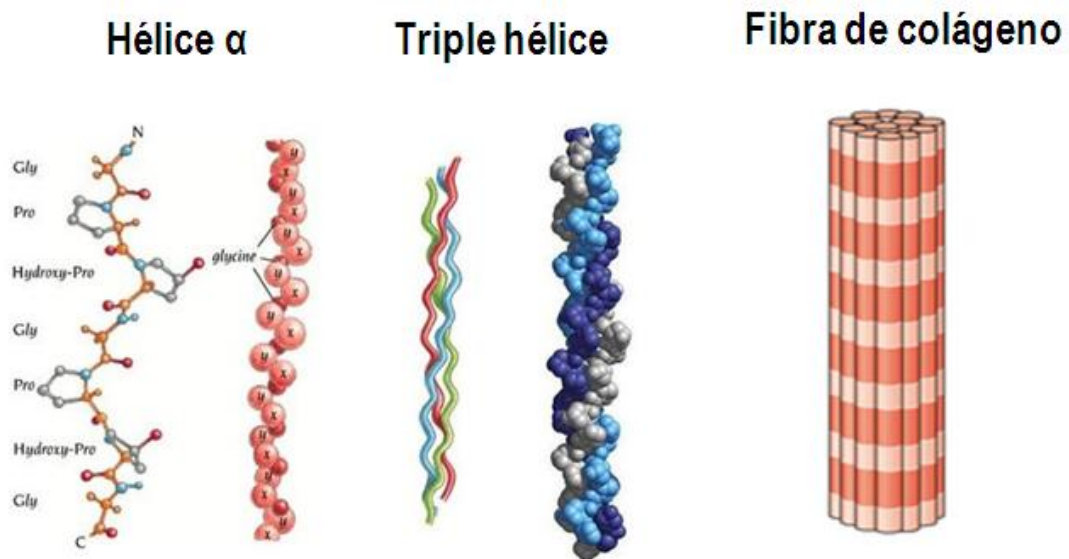
puede completar la transformación hasta gelatina. La gelatina obtenida por este proceso se denomina gelatina B (Básica).

### **Composición y estructura química del Colágeno.**

La piel está conformada predominantemente por colágeno I y en menor cantidad por colágeno III. Está compuesta por tres cadenas que forman una estructura de triple hélice. La cadena individual de colágeno consiste en repeticiones continuas de 4 aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina y un último aminoácido, que es el específico para cada molécula de colágeno. [43]

El colágeno tiene diversas organizaciones supramoleculares, a saber, colágeno formado por fibrillas (FFC), redes formadas por colágeno (CFN), filamentos de colágeno formado de cuentas (BFFC), colágeno asociado a membrana con interrupción de triple hélices (MACIT), colágeno asociado a fibrillas con interrupción de triple hélices (FACIT) y multiplénix (MPC). La más abundante de estas estructuras en la piel es FFC. Otras moléculas como la elastina, proteoglicanos, fibronectina o laminina son unidos entre sí, creando una red junto con los colágenos en la matriz extracelular. [44]

En el caso de la formación de las fibrillas de colágeno, las estructuras de triple hélice están unidas mediante enlaces covalentes con otras fibrillas y estas a su vez con otras hasta formar una fibra de colágeno. [Figura 1] Cada tipo específico de colágeno presenta diferentes tipos de entrecruzamiento, en función del tipo y edad de los animales. Tejidos más densos, como el hueso, presentan un colágeno más reticulado a diferencia de los tejidos blandos. Del mismo modo, tejidos más viejos presentan colágeno más reticulado que los tejidos jóvenes, como ya se mencionó. [40,44]



**Figura 1. Composición y estructura del colágeno: Hélice  $\alpha$ , conformada por repetición en tándem predominantemente de glicina, prolina e hidroxiprolina. Triple hélice, conformada por 3 cadenas  $\alpha$ . Fibra de colágeno, conformada por múltiples triples hélices.**

### **Composición química de la gelatina.**

La transformación de colágeno a gelatina induce cambios moleculares en algunos aminoácidos. Tales variaciones son debidas principalmente al proceso de elaboración. Por ejemplo, el proceso alcalino desamina la glutamina en ácido glutámico y la asparagina en ácido aspártico, de tal modo que la cantidad de ambos ácidos es mayor en la gelatina tipo B.

La caracterización de la cadena polipeptídica de la gelatina no está del todo definida. De acuerdo a la literatura que se revise, se menciona que en las gelatinas de mamíferos, la prolina e hidroxiprolina representan cerca del 30% del total de aminoácidos, sin embargo otros estudios reportan sólo un 23% de ellas. [45,46] [Figura 2]

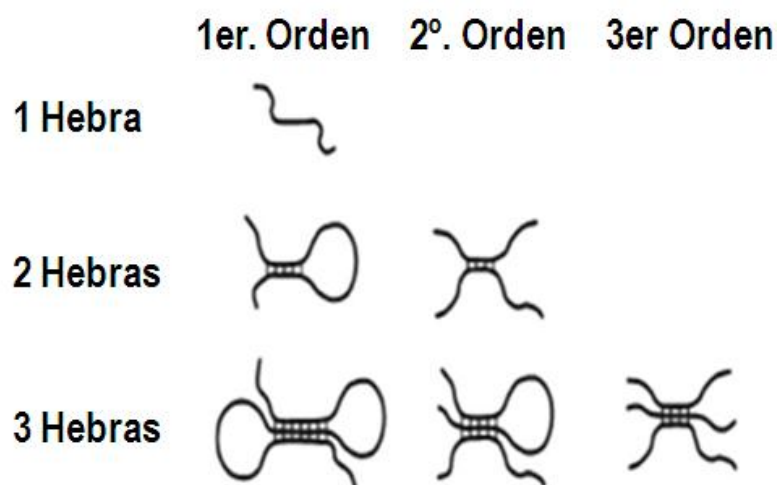
**Cuadro 2. Composición de aminoácidos de la gelatina de obtenida de piel porcina.**

Aminoácido	%
Glicina	32.20
Prolina	13.10
Alanina	11.05
Hidroxiprolina	9.80
Ácido glutámico	7.10
Arginina	4.96
Ácido aspártico	4.42
Serina	3.40
Lisina	2.65
Leucina	2.35
Otros	8.57

### Estructura química de la gelatina.

Durante la desnaturalización parcial del colágeno se pierde su estructura nativa. Las fibras en triple hélice se desdoblán durante el calentamiento y parcialmente recuperan su estructura durante el enfriamiento. Las moléculas de agua son atrapadas entre las cadenas de la gelatina y se crea el gel. La estructura de la gelatina cambiará durante el proceso de la gelación, cambiando sus disposiciones espaciales y sus interacciones de acuerdo a la concentración de gelatina, la temperatura y la energía necesaria para la creación de la estructura secundaria. Ésta puede estar formada por dos cadenas alfa o bien o por un bucle creado por una sola hebra. Del mismo modo, la estructura terciaria se puede crear por tres cadenas alfa diferentes, por dos cadenas alfa en donde una crea un bucle o bien, por una sola cadena alfa con dos bucles. [47]

[Figura 2]



**Figura 2. Diferentes tipos de organización de las cadenas de gelatina. (Guo et al, 2003)**

## **Características Físicas de la Gelatina**

Es un compuesto color blanco, poroso, flexible, biocompatible y biodegradable por hidrólisis en 4 a 6 semanas, con escasa reacción tisular. La propiedad física más importante de la gelatina es la denominada unidad bloom o fuerza de gel, que normalmente se sitúa entre 50 y 300, y que define la firmeza y el poder gelificante de la gelatina. Cuanto más elevado es el valor bloom, mayor es el poder gelificante de la gelatina. Las moléculas de gelatina son únicas en cuanto a estabilización, capacidad de gelificación y manejo. Las propiedades ligantes de la gelatina y su capacidad de convertir los líquidos en gel al enfriarse, y nuevamente en líquidos al calentarse, desempeñan un papel destacado a este respecto.

Debido a todas estas propiedades químicas y físicas, la gelatina es ampliamente usada en la industria alimenticia y farmacéutica.

En medicina se emplea para la creación de cápsulas blandas, duras, pastillas, supositorios y como esponjas hemostáticas. Actualmente con este último fin se utiliza en todas las áreas quirúrgicas y de intervencionismo. Si bien se ocupa desde mediados del siglo pasado no se conoce el método exacto por el cual la gelatina favorece la hemostasia. Se sugiere que sea por efecto mecánico al estabilizar el coágulo de plaquetas. Los estudios de susceptibilidad hemolítica reportan que puede absorber hasta 45 veces su propio peso en sangre, siendo directamente proporcional el porcentaje de la gelatina en la esponja a la capacidad de absorción y por ende, de hemostasia. [40-42, 48]

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Una de las principales dificultades al momento de la resección endoscópica de la mucosa es la adecuada observación del tejido submucoso, especialmente cuando la mucosa a ser resecada tiende a colapsarse sobre el área quirúrgica lo que dificulta mantener el plano de disección y de los vasos sanguíneos, lo cual incrementa el riesgo de dos de las principales complicaciones: hemorragia y perforación. Por tal motivo en la práctica clínica existe una gran variedad de sustancias empleadas para tal fin: solución salina (SS), SS con epinefrina, hidroxipropil metilcelulosa, ácido hialurónico, glicerol, manitol y recientemente el empleo de sangre autóloga y albúmina a diferentes porcentajes. Sin embargo, el empleo de tales agentes posee algunas desventajas, como lo es su costo, accesibilidad, reproductibilidad y efectos adversos. [49-52]

Otros dispositivos como pinzas, sujetadores internos y externos o mixtos se han creado con la finalidad de exponer el tejido submucoso y con ello crear el efecto de tracción contracción y facilitar la disección con menor riesgo de complicaciones. [53-57]

Por otra parte, la gelatina porcina ha sido empleada en diversas áreas de cirugía e intervencionismo, sin embargo no existen antecedentes de su empleo en el área de endoscopia gastrointestinal como sustancia inyectable en la submucosa para crear un colchón para la resección de la mucosa.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Al no existir una sustancia ideal para crear un colchón submucoso para la resección endoscópica de la mucosa que proporcione un volumen suficiente y necesario para completar la disección, que sea hemostático y que cree un soporte consistente que permita la extracción en un solo bloque y de manera completa, hemos querido evaluar la eficacia de una matriz de gelatina absorbible, aprovechando sus propiedades físicas de absorción, incremento de volumen y hemostáticas, no empleadas con anterioridad para este fin.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es eficaz la gelatina absorbible en la creación de un colchón submucoso para la resección de mucosa gástrica?

## **HIPÓTESIS.**

La gelatina porcina puede absorber hasta 45 veces su peso corporal en líquido e incrementar al doble su volumen de forma sostenida, por lo que la inyección submucosa de una matriz de gelatina porcina será más eficaz que la solución salina 0.9% + adrenalina 1/10 000 al proporcionar un colchón submucoso con un volumen mínimo de 750 mm<sup>3</sup> por cada mililitro de solución evaluada y una permanencia mínima de 74 minutos, en un modelo experimental para la resección de mucosa gástrica.



## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la eficacia de una matriz de gelatina porcina absorbible para la creación de un colchón submucoso en la resección de la mucosa gástrica, comparado con la solución salina 0.9% + epinefrina 1/10 000.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Medir el tiempo (minutos) de permanencia del colchón submucoso formado con gelatina y SS+E.
- Medir el volumen (longitud, anchura y altura) del colchón submucoso formado con gelatina y SS+E.
- Evaluar el efecto hemostático transprocedimiento (presencia macroscópica o no de hemorragia) tras la resección de la mucosa gástrica en el sitio previamente infiltrado con gelatina y con SS+E.
- Evaluar la integridad (ausencia de soluciones de continuidad) de las capas adyacentes a la submucosa en el sitio previamente infiltrado con gelatina y con SS+E.
- Evaluar la presencia de un proceso inflamatorio agudo (edema en la lámina propia, presencia de leucocitos por encima de la membrana basal y/o soluciones de continuidad en la muscularis mucosae) en el sitio de mucosa gástrica previamente infiltrado con gelatina y con SS+E.
- Valorar el efecto disector (expansión de la túnica submucosa, con división de la misma hacia la mucosa y la muscular propia) en el sitio previamente infiltrado con gelatina y con SS+E.

## **METODOLOGÍA.**

**TIPO DE ESTUDIO.** Experimental.

**POBLACIÓN.** Animales del laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

Ratas macho, raza Wistar de 250 a 300 gr, sanas.

Puerco macho, raza York Shire de 25 a 30 kg, sano.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

Ratas y puerco que hayan sido población de protocolos previos.

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.**

Animales que fallezcan durante el procedimiento o durante el seguimiento.

## CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para realizar el cálculo del tamaño de muestra usamos la fórmula para diferencia de medias. Ocupamos la variable cuantitativa continua de *Tiempo de permanencia del colchón submucoso* reportada por Lenz L et al, [58] en el que compara en un modelo porcino los tiempos de permanencia de los colchones submucosos creados con solución salina, carboximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Se calculó la desviación estándar con los valores de la más durable, que fue la HPMC. En cuanto a la magnitud de la diferencia apostamos en nuestra hipótesis que el colchón de gelatina durará el doble (74 minutos) de lo reportado por Lenz: 37minutos.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Z alfa: 1.96 (error 0.05)  
Z beta: 0.842 (poder de 0.8)  
S: 15.73 min  
d: 37 min

$$n = \frac{2(1.96 + 0.842)^2 * (15.73)^2}{(37)^2}$$
$$\frac{2(7.85)^2 * 247.43}{1369}$$
$$\frac{15.7 * 247.43}{1369} = \frac{3884.651}{1369} = 2.837$$

## DEFINICIÓN DE VARIABLES.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>				
Inyección de sustancias: SS+E/GELATINA	Procedimiento a través del cual se hace pasar SS+E o Gelatina por una jeringa en la submucosa para crear un colchón.	Procedimiento en el que se pasa 1 ml de SS+E o 1 ml de gelatina en el modelo murino; y 3 ml respectivamente en el modelo porcino, para crear un colchón submucoso.	Cualitativa nominal.	Presente/Ausente.
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>				
Volumen del colchón submucoso.	Extensión en tres dimensiones de una región del espacio.	Espacio ocupado en tres dimensiones (longitud, ancho y altura) tras la inyección de SS+E o GELATINA.	Cuantitativa continua	mm <sup>3</sup>
Tiempo de permanencia del colchón submucoso	Magnitud física con la que se mide la duración del cambio de un acontecimiento.	Duración del colchón submucoso a partir del tiempo 0 en el que se inyecta la sustancia hasta el tiempo en el que desaparece el colchón o alcanza los 74 minutos.	Cuantitativa continua	Minutos

Hemorragia transprocedimiento	Salida de sangre del sistema cardiovascular tras la ruptura de vasos sanguíneos.	Presencia de sangre macroscópica del sitio de la resección mucosa.	Cualitativa nominal	Presente/Ausente
Integridad de las capas adyacentes a la túnica submucosa.	Entereza de las tónicas contiguas a la submucosa.	Ausencia de soluciones de continuidad en las tónicas adyacentes a la submucosa en el sitio de la inyección de las sustancias a medir.	Cualitativa Nominal	Presente/Ausente
Presencia de proceso inflamatorio agudo	Proceso relativamente breve que dura unos minutos u horas y que se caracteriza por exudación de líquido y migración de leucocitos.	Presencia de edema en la lámina propia y/o de leucocitos por encima de la membrana basal y/o soluciones de continuidad en la muscularis mucosae.	Cualitativa nominal	Presente/Ausente
Efecto disector	División en partes.	Expansión de la túnica submucosa con división de la misma hacia los costados (mucosa, muscular y transversalmente hacia la misma submucosa).	Cualitativa nominal	Presente/Ausente

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se analizaron con el software estadístico (SPSS v.11.5; SPSS Corp., Chicago, USA). Para las variables cuantitativas continuas, se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar. Se realizó un análisis bidimensional de Friedman para muestras relacionadas. Para las variables cualitativas se realizó un análisis de tablas de contingencia mediante el test exacto de Fisher. Una  $P < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa.

## PROCEDIMIENTO.

### Preparación de la matriz de gelatina.

Para la elaboración de la matriz se empleó Spongostan (Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, USA) gelatina porcina. Como disolvente se utilizó solución fisiológica 0.9%. Cada dilución se realizó inmediatamente antes de su inyección. Las concentraciones de gelatina utilizadas fueron de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg y 35 mg, cada una en 2ml, 3ml, 4ml y 5ml de NaCl 0.9% a una temperatura ambiente de 25 °C. Para el modelo ex – vivo (estómago porcino) se le añadió a la dilución azul de metileno al 0.5%. Se inyectaron 2ml de cada una de las diluciones en la submucosa del estómago porcino con una jeringa de 10 cc de 21 gauge (diámetro interno de 0.8 mm). Se valoró el paso de la gelatina a través de la jeringa (sin dificultad / con dificultad) al momento de la inyección, se cuantificó el tiempo en minutos que permanecían los colchones hasta un máximo de 80 minutos y posteriormente se reseco con bisturí la mucosa por encima del colchón previamente creado. Se seleccionó la matriz que contenía una concentración de 20 mg de gelatina en 2 ml de solución salina para su empleo en el modelo animal debido a su inyección sin dificultad a través de la aguja de 21 gauge y su tiempo de permanencia mayor como colchón. [Figura 3]

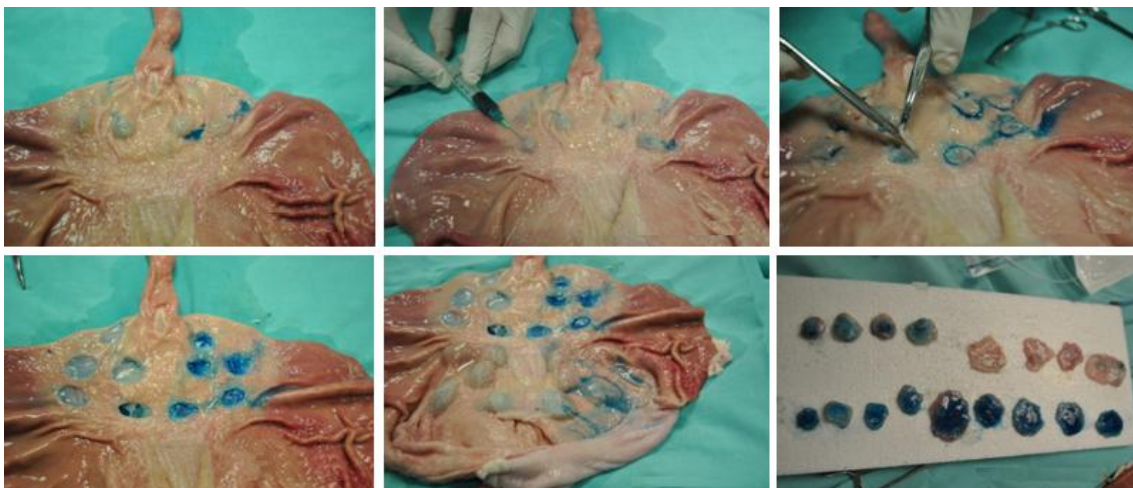


Figura 3. Inyección de la gelatina en modelo ex vivo.

## Modelo Murino

Para el desarrollo del experimento se contó con la colaboración de 3 investigadores, cada uno con una función específica durante el procedimiento: el primero, preparó la matriz de gelatina, cargo, cubrió las jeringas y asistió al cirujano; el segundo, inyectó las sustancias y operó; y el tercero, realizó las mediciones. [Figura 4]



**Figura 4. Labor de cada uno de los 3 investigadores durante la fase experimental animal.**

Mediante aleatorización simple se seleccionaron 3 ratas y previa valoración por el veterinario, ayuno de 8 horas y agua *ad libitum* se anestesiaron con ketamina 0.1mg/kg + xilacina 0.5mg/kg. Se preparó la matriz de gelatina y se cargaron las jeringas, cubiertas con cinta canela, con 1ml de cada solución: Grupo A, gelatina; Grupo B, SS+E.

Se realizó laparotomía media, se expuso el estómago y se realizó una gastrotomía a todo lo largo del cuerpo gástrico. Se lavó la cavidad gástrica con solución fisiológica tibia y a continuación se inyectó (jeringa de 21 gauge) en la submucosa del lado derecho 1 ml de una de las sustancias y en el lado izquierdo 1 ml de la otra. [Figura 4] Si la mucosa no elevaba después de 0.5 ml, la aguja se volvía a introducir en un sitio diferente hasta crear un colchón exitoso, definido éste, como la descarga de todo el contenido de la jeringa, observando inmediatamente un abultamiento submucoso. Con un vernier digital, se realizaron mediciones de



la altura, ancho y longitud del colchón submucoso creado con ambas sustancias en el tiempo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 75 minutos. Posteriormente se realizó la resección con bisturí de 1cm de mucosa sobre el sitio de los colchones submucosos y se evaluó categóricamente la presencia macroscópica de hemorragia en el sitio de la resección.



**Figura 5. Creación del colchón submucoso gástrico en modelo murino.**

En otra área del estómago, a 0.5 cm de los sitios de resección mucosa previa, se inyectó nuevamente 1 ml de cada solución, uno en cada lado del estómago, y se realizó una resección completa de la pared (de mucosa a serosa) en los sitios donde se crearon los colchones submucosos. Se sacrificaron los animales con sobredosis anestésica por kg de peso y cloruro de potasio. Se colocó la pieza resecada en formol amortiguado durante 48 horas.

#### **Estudio histológico.**

Se fijaron los bloques en parafina, se cortaron y tiñeron con técnica de hematoxilina/eosina y Masson. Por microscopía se evaluó la integridad de las capas de la pared abdominal, presencia o no de soluciones de continuidad de la muscularis mucosae, presencia o no de leucocitos por encima de la membrana basal, presencia de edema en la lámina propia y la expansión de la túnica submucosa tras la inyección de las dos sustancias.

## Modelo porcino

El modelo experimental porcino se realizó con los tres investigadores que participaron en el modelo murino, realizando cada uno su labor previa.

Se seleccionó aleatoriamente 1 cerdo de 27 kg de peso, sano y sin que hubiera participado en protocolos anteriores. Previa valoración del veterinario y ayuno de 8 horas se anestesió con zoletil (tiletamina/zolazepam) 7.5 – 25 mg/kg y se intubó orotraquealmente. Se preparó la matriz de gelatina y se cargaron las jeringas, cubiertas con cinta canela, con 3ml de cada solución: Grupo A, gelatina; Grupo B, SS+E.

Se realizó asepsia de la región a operar, laparotomía media, se expuso el estómago y se realizó una gastrotomía a todo lo largo del cuerpo gástrico. Se lavó la cavidad gástrica con solución fisiológica tibia y a continuación se inyectó con jeringa de 21 gauge en la submucosa del fondo del lado derecho 3 ml de una de las sustancias y en el fondo del lado izquierdo 3 ml de la otra. Si la mucosa no elevaba después de 0.5 ml, la aguja se volvía a introducir en un sitio diferente hasta crear un colchón exitoso. Se repitió el procedimiento inyectando 3ml de una de las sustancias en el cuerpo gástrico del lado derecho, en dos sitios diferentes, con una distancia de 3 cm una de la otra; y a su vez en el cuerpo del lado izquierdo con la otra sustancia. [Figura 5] Finalmente se repitió el mismo procedimiento en el antro gástrico de cada lado. Con un vernier digital, se realizaron mediciones de la altura, ancho y longitud del colchón submucoso creado con ambas sustancias en el tiempo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 75 minutos. Posteriormente se realizó la resección con bisturí de 2cm de mucosa sobre el sitio de los colchones submucosos y se evaluó categóricamente la presencia macroscópica de hemorragia en el sitio de la resección.



**Figura 6. Creación del colchón submucoso gástrico en modelo porcino.**

En otra área del cuerpo gástrico, a una distancia de 3 cm de los sitios de resección mucosa previa, se inyectó nuevamente 3 ml de cada solución, en ambos lados del estómago, y se realizó una resección completa de la pared (de mucosa a serosa) en los sitios donde se crearon los colchones submucosos. Se sacrificó el animal con sobredosis anestésica por kg de peso y cloruro de potasio. Y se colocó la pieza resecada en formol amortiguado durante 48 horas.

#### **Estudio histológico.**

Se fijaron los bloques en parafina, se cortaron y tiñeron con técnica de hematoxilina/eosina y Masson. Por microscopía se evaluó la integridad de las capas de la pared abdominal, presencia o no de soluciones de continuidad de la muscularis mucosae, presencia o no de leucocitos por encima de la membrana basal, presencia de edema en la lámina propia y la expansión de la túnica submucosa tras la inyección de las dos sustancias.

## RESULTADOS

En la etapa experimental del modelo murino, se incluyeron un total de 3 ratas. La muestra estuvo conformada por 6 observaciones: 3 colchones submucosos creados con gelatina y 3 con SS+E. El tiempo en minutos de permanencia del colchón con la SS+E fue de 4.38 minutos en promedio, con un intervalo de 3.45 a 5.20 y de la gelatina absorbible mayor de 75 minutos en las 3 observaciones (las mediciones se detuvieron a los 75 minutos). [Cuadro 3] Se realizó un análisis bidimensional de Friedman de varianza por intervalos para muestras relacionadas (volumen inicial /10 min/ 20 minutos) obteniendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.004$ ). [Figura 7 a 10]

**Cuadro 3. Comparación del tiempo y volumen de los colchones submucosos en el modelo murino.**

Solución	Tiempo de permanencia (min)			Volumen inicial (mm <sup>3</sup> )		Volumen a los 10 (mm <sup>3</sup> )		Volumen a los 20 (mm <sup>3</sup> )	
	R 1	R 2	R 3	X	DE	X	DE	X	DE
<b>SS + E</b>	5.20	3.45	4.50	919,94	27,85	55,73	21,75	0	0
<b>GELATINA</b>	> 75			1494,35	229,90	1456,03	289,28	1203,49	156,77

SS+E, Solución salina más epinefrina; min, minutos; R, rata; mm<sup>3</sup>, milímetros cúbicos; X, promedio; DE, desviación estándar.

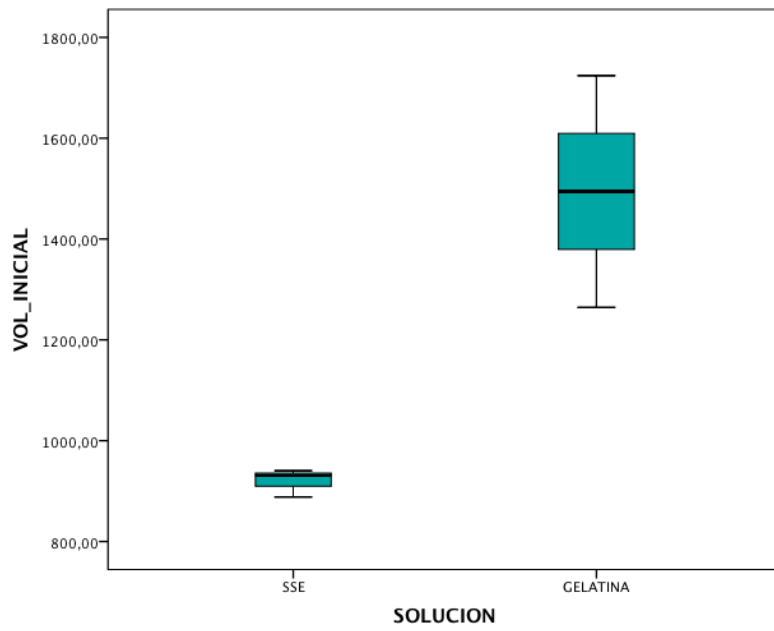


Figura 7. Gráfica de caja y bigotes para el volumen inicial de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.

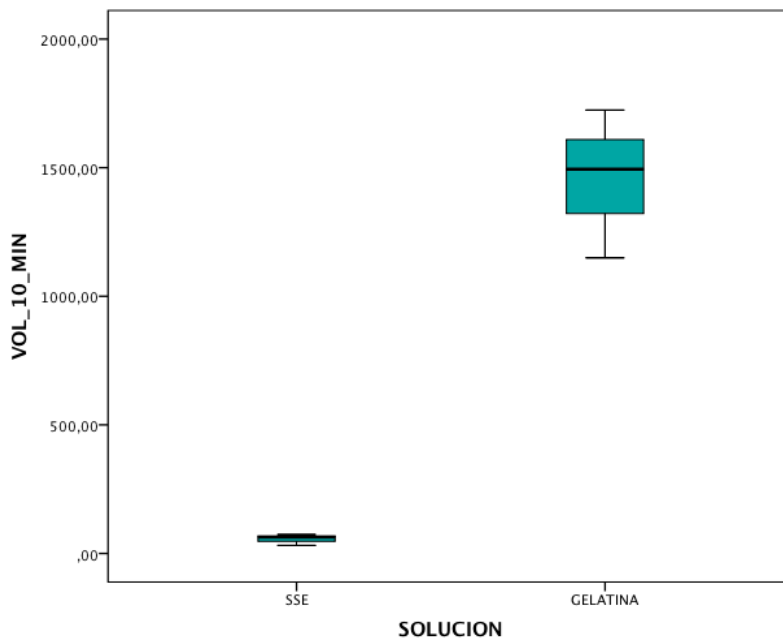


Figura 8. Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 10 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.

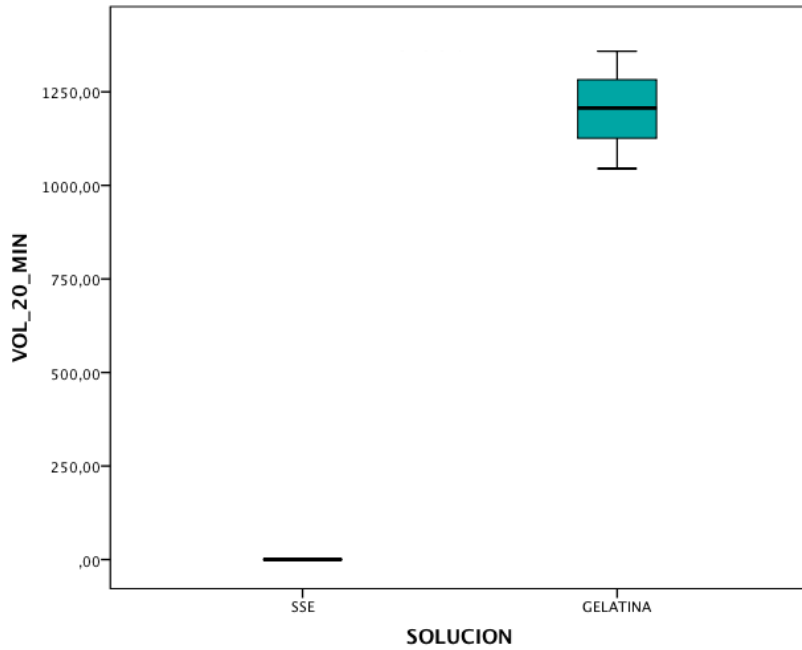
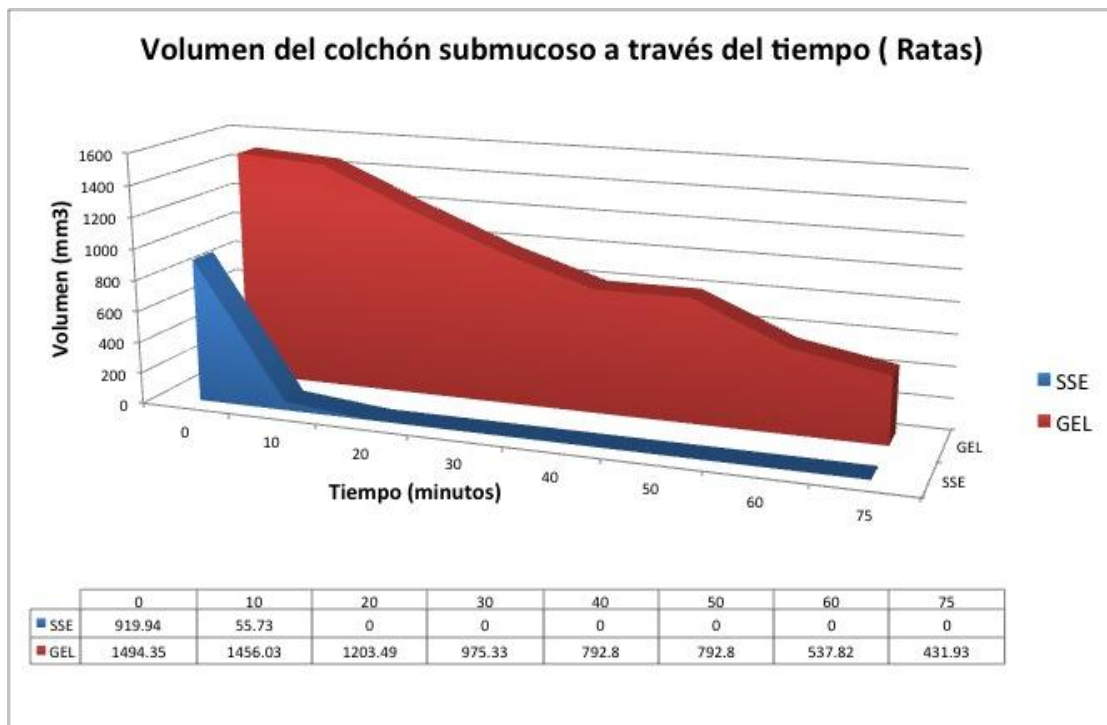


Figura 9. Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 20 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.



SS+E, solución salina + epinefrina; GEL, gelatina porcina absorbible.

Figura 10. Gráfica comparativa que muestra el volumen del colchón submucoso con ambas sustancias a lo largo del tiempo.

Se evaluó categóricamente la presencia o no, de hemorragia macroscópica inmediatamente posterior a la resección de mucosa, observando que ésta se presentó en todos los casos cuando se había inyectado SS+E y en ningún caso con la gelatina. Se realizó un análisis con tabla de contingencia mediante un test exacto de Fisher, sin encontrar diferencia estadística significativa con un valor de p de 0.10 [Cuadro 4]

**Cuadro 4. Tabla de contingencia para hemorragia post resección de mucosa.**

Solución	Hemorragia		Total
	NO	SÍ	
<b>SS + E</b>	0	3	3
<b>GELATINA</b>	3	0	3
Total	3	3	6
SS+E, solución salina 0.9% más epinefrina.			

En relación al efecto disector en la submucosa, se evaluó mediante el estudio histológico de las piezas quirúrgicas, con tinciones de hematoxilina/eosina y Masson la expansión de la túnica submucosa y la división de la misma hacia la mucosa y la muscular propia [Figura 11 y 12] observando que este efecto estuvo ausente en todos los casos de SS+E y presente en aquellos con gelatina; se realizó un análisis con tabla de contingencia mediante un test exacto de Fisher, sin encontrar diferencia estadística significativa con un valor de p de 0.10 [Cuadro 5]

**Cuadro 5. Tabla de contingencia para el efecto disector.**

Solución	Efecto Disector		Total
	NO	SÍ	
<b>SS + E</b>	3	0	3
<b>GELATINA</b>	0	3	3
Total	3	3	6
SS+E, solución salina 0.9% más epinefrina.			

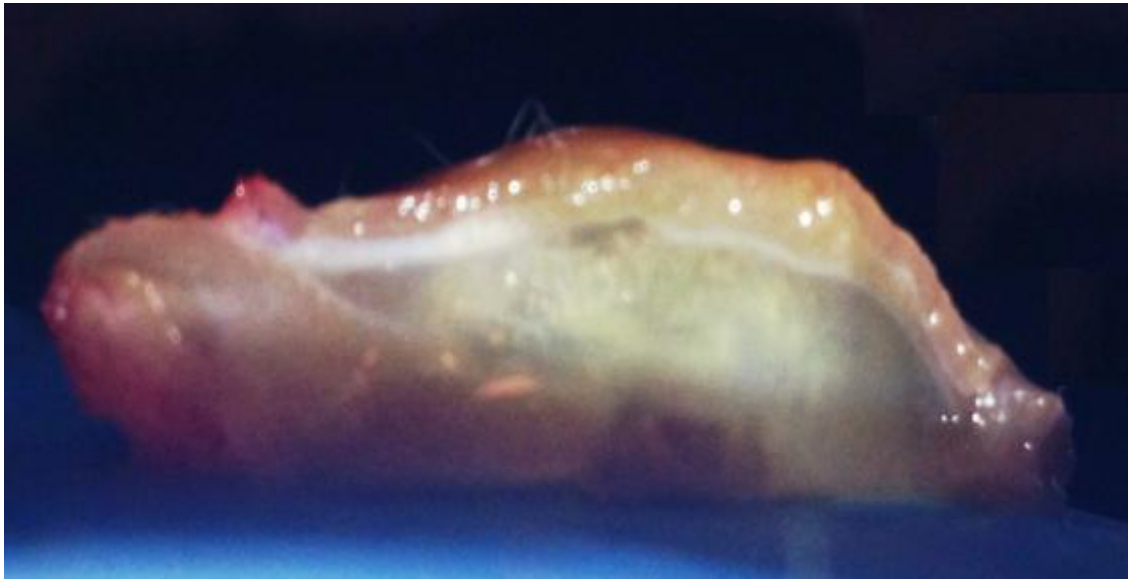


Figura 11. Biopsia de estómago de rata que ejemplifica el colchón submucoso con 1 ml de gelatina.

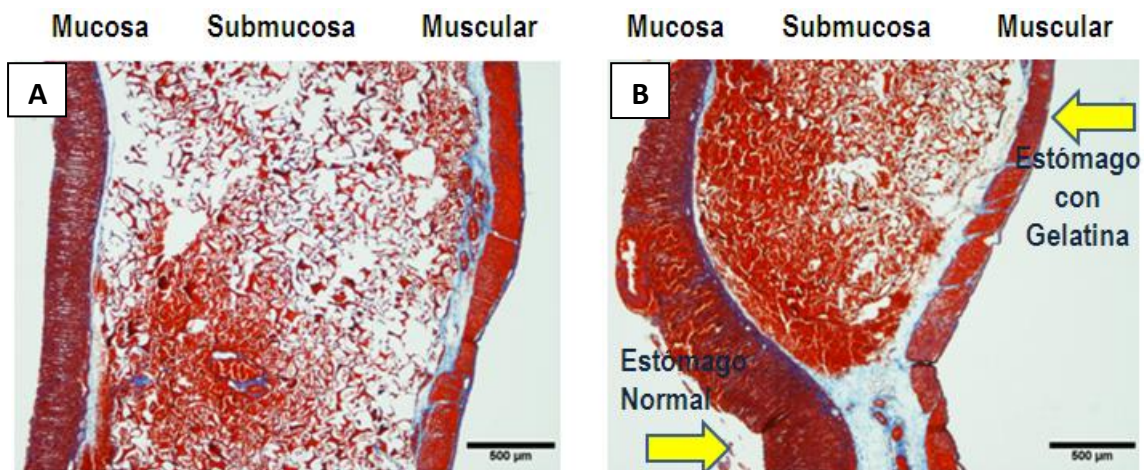
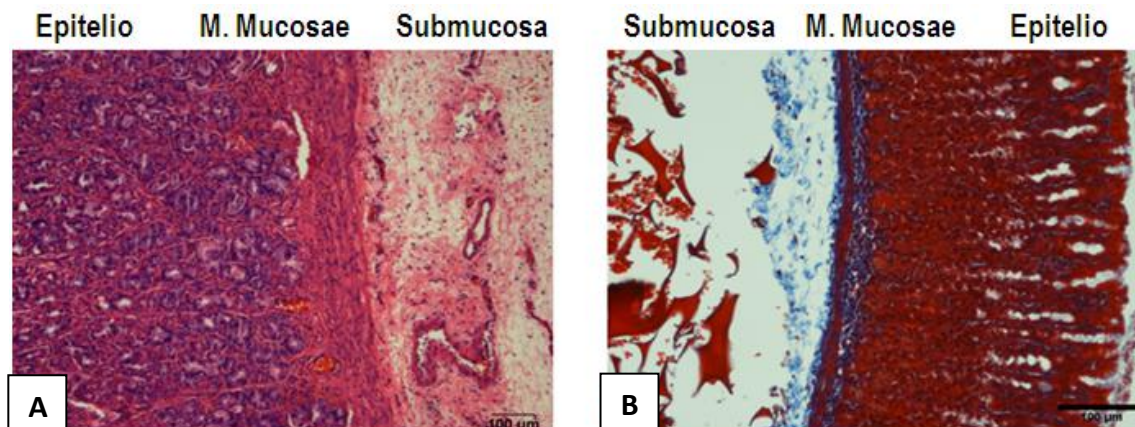


Figura 12. A. Corte histológico de un colchón creado con 1 ml de gelatina en un estómago de rata a los 10 minutos de haber sido inyectado, teñido con técnica de Masson que ejemplifica la expansión de la túnica submucosa y la división de la misma hacia la mucosa y la muscular propia. B. Corte histológico de un colchón creado con 1 ml de gelatina en un estómago de rata a los 10 minutos de haber sido inyectado, teñido con técnica de Masson que ejemplifica pared gástrica normal (inferior) y pared gástrica con la disección de la túnica submucosa (superior).



Para la evaluación de la integridad de las tunicas de la pared gástrica adyacentes al colchón submucoso y el proceso inflamatorio agudo, se realizó el estudio morfológico de las piezas quirúrgicas mediante microscopía convencional, observando íntegras todas las capas de la pared gástrica posterior a la inyección de ambas sustancias. Cabe resaltar que no se observó edema en la lámina propia, tampoco presencia de leucocitos por encima de la membrana basal, ni soluciones de continuidad en la muscular de la mucosa con ambas soluciones. [Figura 13]



**Figura 13. Corte histológico de un colchón creado con 3 ml de gelatina en el estómago del puerco a los 5 min de haber sido inyectado, que ejemplifica la integridad epitelial, ausencia de edema en la lámina propia y de leucocitos por encima de la membrana basal**  
A. Colchón de SS+E con tinción de hematoxilina/eosina. B. Colchón de gelatina con tinción de Masson.

En la segunda etapa experimental, modelo porcino, la muestra estuvo conformada por 8 observaciones: 4 colchones submucosos creados con gelatina porcina absorbible y 4 con SS+E. El tiempo de permanencia del colchón con la SS+E fue de 9.1 minutos en promedio, con un intervalo de 7.5 a 10.8 minutos y de la gelatina, mayor a 75 minutos en todos los casos. [Cuadro 6] Se realizó un análisis bidimensional de Friedman de varianza por intervalos para muestras relacionadas (volumen inicial /10 min/ 20 minutos) y se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.001$ ). [Figura 14 a 17]

**Cuadro 6. Comparación del tiempo y volumen de los colchones submucosos en el modelo porcino.**

Solución	Tiempo de permanencia (minutos)				Volumen inicial (mm <sup>3</sup> )		Volumen a los 10 min (mm <sup>3</sup> )		Volumen a los 20 min (mm <sup>3</sup> )	
	P 1	P 2	P 3	P 4	X	DE	X	DE	X	DE
<b>SS + E</b>	8.7	9.4	7.5	10.8	6591,33	1917,93	630,91	263,65	4,44	5,14
<b>GELATINA</b>	> 75				12963,74	1391,14	12538,17	1738,69	10422,56	1015,20

SS+E, Solución salina más epinefrina; min, minutos; P, puerco; mm<sup>3</sup>, milímetros cúbicos; X, promedio; DE, desviación estándar.

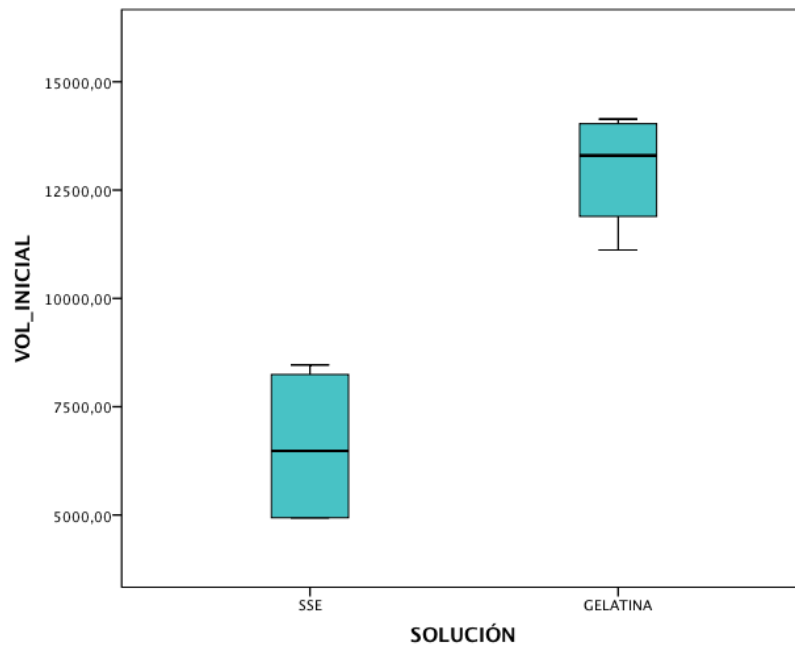


Figura 14. Gráfica de caja y bigotes para el volumen inicial de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.

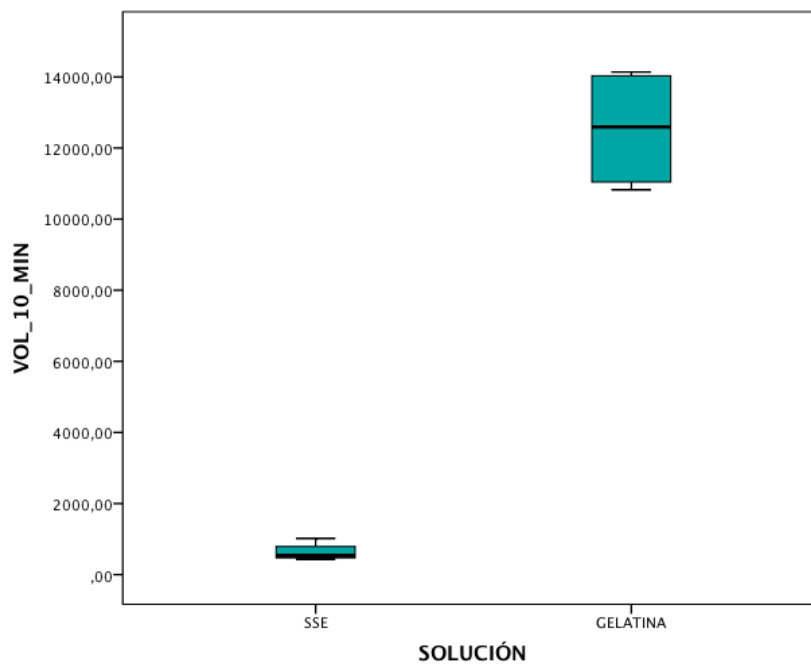


Figura 15. Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 10 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.

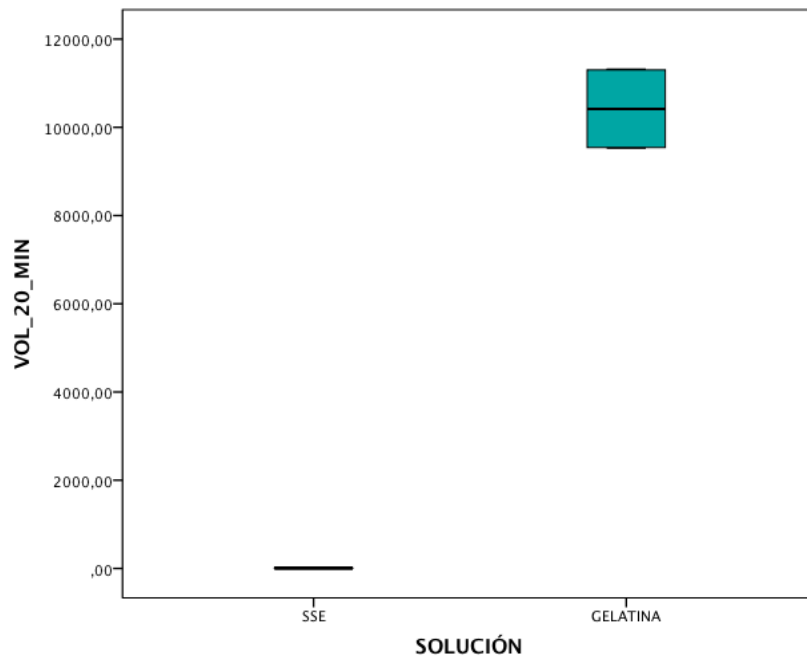
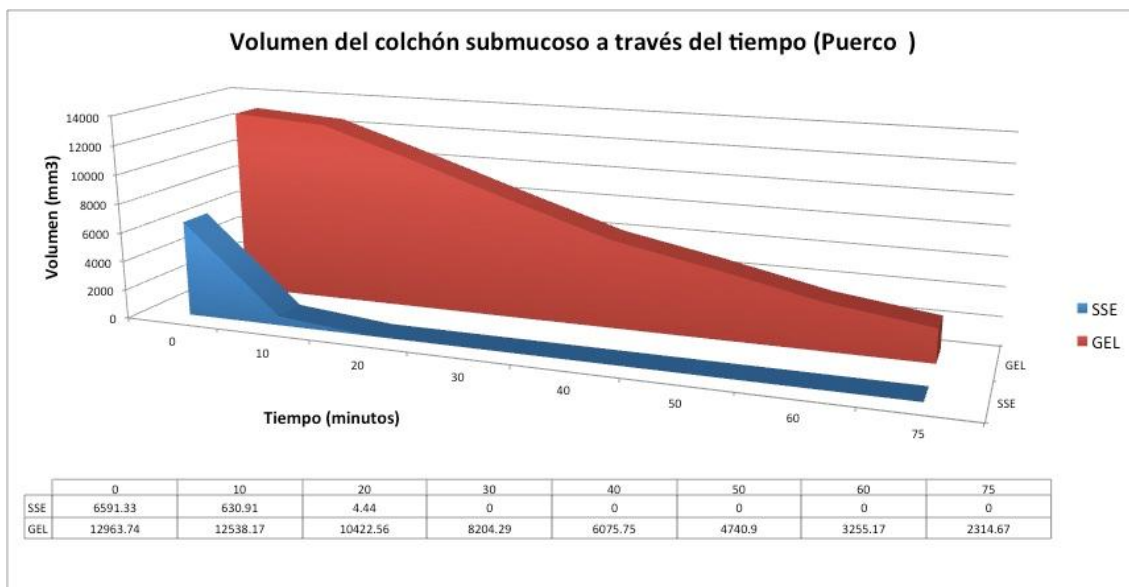


Figura 16. Gráfica de caja y bigotes para el volumen a los 20 min de los colchones submucosos con SS+E vs Gelatina.



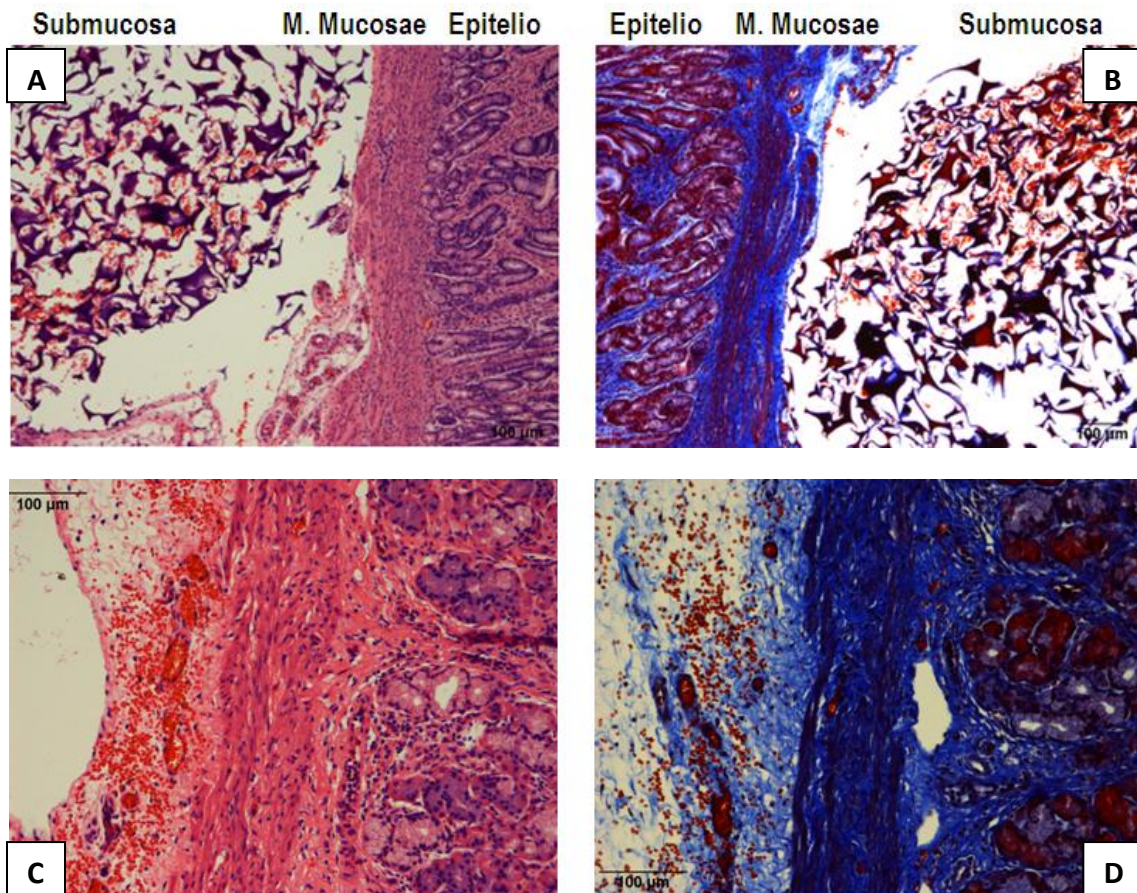
SS+E, solución salina + epinefrina; GEL, gelatina porcina absorbible.

Figura 17. Gráfica comparativa que muestra el volumen del colchón submucoso con ambas sustancias a lo largo del tiempo.

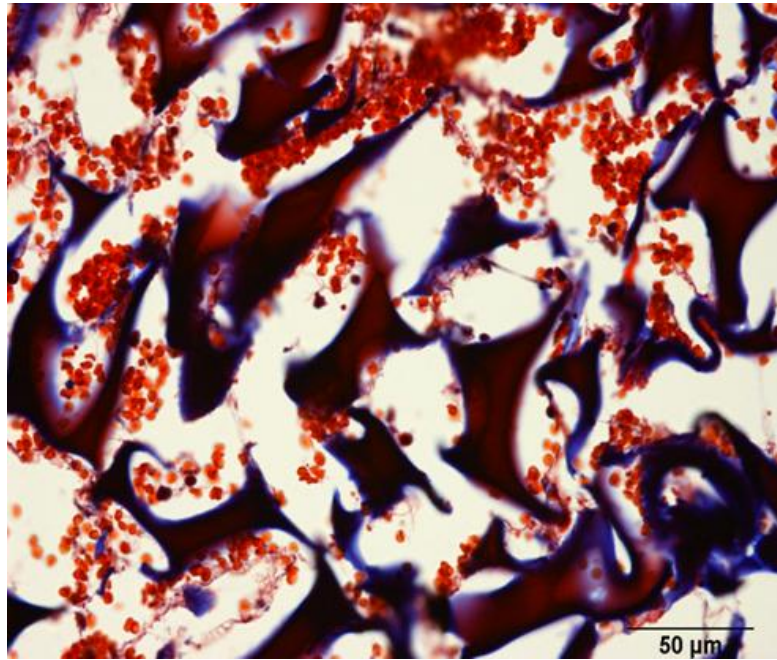
Se evaluó categóricamente la presencia o no, de hemorragia macroscópica inmediatamente posterior a la resección de mucosa, observando que ésta se presentó en los 4 casos cuando se había inyectado SS+E y en 1 caso con gelatina. Se realizó un análisis con tabla de contingencia mediante un test exacto de Fisher, sin encontrar diferencia estadística significativa con un valor de p de 0.14 [Cuadro 7] En la evaluación morfológica mediante microscopía convencional, se observaron imágenes romboideas (gelatina) envolviendo los eritrocitos y apartándolos de la túnica mucosa, lo que contrasta con las biopsias gástricas postinyección de SS+E en las cuales se observaron los eritrocitos agrupados inmediatamente por debajo de la muscular de la mucosa. [Figura 18 y 19]

**Cuadro 7. Tabla de contingencia para hemorragia.**

Solución	Hemorragia		Total
	NO	SÍ	
<b>SS + E</b>	0	4	4
<b>GELATINA</b>	3	1	4
Total	3	5	8
SS+E, solución salina 0.9% más epinefrina.			



**Fig. 18** A y B Colchones submucosos creados con gelatina, la cual envuelve los eritrocitos aislándolos de la muscularis mucosae. Tinción de hematoxilina-eosina y Masson, respectivamente. C y D Colchones submucosos creados con SS+E. Se observan los eritrocitos agrupados inmediatamente por debajo de la muscular de la mucosa. Tinción de hematoxilina-eosina y Masson, respectivamente.



**Fig. 19 Gelatina en la túnica submucosa envolviendo eritrocitos.**

En relación al efecto disector de la submucosa, se evaluó mediante estudio histológico de las piezas quirúrgicas, con tinciones de hematoxilina/eosina y Masson la expansión de la túnica submucosa y la división de la misma hacia los costados (mucosa y muscular propia) observando que este efecto estuvo ausente en todos los casos en que se usó SS+E y presente en todos los casos con gelatina; se realizó un análisis con tabla de contingencia mediante un test exacto de Fisher, encontrando diferencia estadística significativa con un valor de  $p$  de 0.02. [Cuadro 8]

**Cuadro 8. Tabla de contingencia para el efecto disector.**

Solución	Efecto Disector		Total
	NO	SÍ	
SS + E	4	0	4
GELATINA	0	4	4
Total	4	4	8
SS+E, solución salina 0.9% más epinefrina.			

Para la evaluación de la integridad de las tunicas de la pared gástrica adyacentes al colchón submucoso y el proceso inflamatorio agudo, se realizó el estudio morfológico de las piezas quirúrgicas mediante microscopía convencional, observando íntegras todas las capas de la pared gástrica posterior a la inyección de ambas sustancias. Cabe resaltar, que al igual que en el modelo murino, no se observó edema en la lámina propia, tampoco presencia de leucocitos por encima de la membrana basal ni de soluciones de continuidad en la muscular de la mucosa con ambas soluciones.



## DISCUSIÓN

De acuerdo a la actualización de la clasificación de Paris, sobre lesiones neoplásicas superficiales del tracto digestivo [2] se considera como tal una lesión neoplásica superficial aquella cuya profundidad de invasión esté limitada a la mucosa o submucosa y que sea factible resecar con fines curativos. Los métodos empleados para tal fin son la resección endoscópica de la mucosa y la disección endoscópica de la submucosa. Para incrementar la tasa de éxito y disminuir las dos principales complicaciones (sangrado y perforación) en cualquiera de las dos técnicas es necesario crear un adecuado colchón submucoso, que provea un volumen y tiempo suficiente para realizar el procedimiento.

Con esta finalidad, se han evaluado diferentes sustancias. Giday et al [50] realizaron un estudio en cerdos en el que evaluaron el tiempo de permanencia de diferentes sustancias tras la inyección de 5 ml de cada una de ellas. Así reportaron  $4.8 \pm 1.56$  min para la solución salina;  $5.68 \pm 3.48$  min para la albumina al 12.5 %;  $7.83 \pm 2.02$  min para la albumina 25 %;  $9.77 \pm 1.55$  min para la hidroxipropilmetil celulosa; y  $38.6 \pm 6.07$  min para la sangre autóloga. Lenz et al, [58] inyectaron 6 ml en un modelo porcino, comparando carboximetilcelulosa 0.5% vs hidroxipropilmetilcelulosa 0.25% vs solución salina normal. Sus resultados reportados fueron una media de 19 min (intervalo 8 a 37 min) para los colchones creados con solución salina; 31 min (intervalo 10 a 43 min) para la carboximetilcelulosa; y 37 min (intervalo 12-60 min) para la hidroxipropilmetilcelulosa.

En nuestro trabajo todas las observaciones tanto en el modelo murino como porcino, tuvieron un tiempo de permanencia del colchón submucoso creado con la gelatina, mayor a 75 minutos con 1ml y 3ml respectivamente. Cabe resaltar que la cantidad inyectada de la gelatina en este estudio fue menor a la cantidad inyectada de las sustancias de Giday et al, manteniendo a pesar de ello, un colchón más duradero incluso que cuando se aplicó sangre autóloga. Nosotros detuvimos el conteo a los 75 minutos para los colchones de gelatina, con lo cual observamos mayor constancia y durabilidad con menor cantidad de sustancia que la reportada por Lenz et al.

Estructuralmente la molécula de la gelatina está compuesta por secuencias de tripletes repetidos de aminoácidos. Estas secuencias son las responsables de la estructura en triple hélice y por consiguiente de su capacidad para formar geles debido a que las regiones helicoidales forman cadenas de proteínas de gelatina que inmovilizan las moléculas de agua, dándole su capacidad absorbente y por consiguiente su incremento de volumen. [59] En nuestro estudio se observó que con la misma cantidad aplicada de ambas soluciones, se obtenía más

del doble del volumen con la gelatina (12,963 mm<sup>3</sup>) que con la SS+ E (6,591 mm<sup>3</sup>), inmediatamente después de la inyección. A los 10 min de inyectadas las soluciones, el volumen de la SS+E fue de 630.9 mm<sup>3</sup> y el de la gelatina en promedio 26 veces mayor (12,538) casi idéntico al volumen inicial. Diferencia que se incrementó conforme se comparaban ambas sustancias en el eje del tiempo. Nuestra hipótesis establecía un volumen mínimo de 750 mm<sup>3</sup> por cada mililitro de solución inyectada. En el caso del modelo murino se mantuvo ese volumen por arriba a los 50 min. En el caso del puerco se mantuvo dicha afirmación por arriba de los 75 minutos. No encontramos en nuestra búsqueda bibliográfica ningún estudio previo que correlacione volumen vs tiempo. Todos correlacionan tiempo vs tamaño. [50,51, 57-60]

La gelatina es usada como agente hemostático pasivo tópico desde los años 50's. Actualmente es empleada en todas las áreas quirúrgicas de la medicina, odontología y veterinaria. Los estudios de susceptibilidad hemolítica reportan que puede absorber hasta 45 veces su propio peso en líquidos, siendo directamente proporcional el porcentaje de la gelatina en la esponja a la capacidad de absorción y por ende, de hemostasia. [37-40, 59, 61] Aún cuando en este estudio no se realizaron suficientes observaciones para demostrar estadísticamente un efecto hemostático de la gelatina, sí se observó una tendencia hacia ésta al registrar un solo episodio de sangrado posterior al procedimiento en ambos modelos. En el estudio histológico se observó cómo las partículas de gelatina al absorber la sangre, envuelve los eritrocitos y los mantiene agrupados dentro de ella, lo que puede explicar la estabilidad del coágulo observado tras la mucosectomía. Cabe resaltar que éste es el primer estudio que emplea hemostáticos pasivos tópicos para la creación de un colchón submucoso.

Posterior al estudio histológico de los colchones creados con gelatina, observamos el incremento de la túnica submucosa, siendo ésta rechazada a las capas adyacentes (mucosa y muscular propia) por las partículas de gelatina. Este efecto de disección mecánica puede ser explicado por la absorción y consecuente aumento de volumen de las partículas de la gelatina que ejercen una compresión radial. El análisis mecánico de la esponja de gelatina demuestra que a mayor concentración de gelatina mayor es la compresión modular ( $E_c$ ). Se dice que una esponja con sólo 2% de gelatina tiene un efecto de compresión ( $E_c$ ) de 400KPa. [59,61] Estos hallazgos no fueron observados en ningún colchón creado con SS+E. Las sustancias de uso común reportadas en la literatura tampoco presentan este efecto mecánico. [50,51,58-60]

Para hablar histológicamente de un proceso inflamatorio agudo, la lámina propia suele presentar un edema de leve a moderado, encontrar leucocitos (predominantemente neutrófilos) por encima de la membrana basal o bien, observar soluciones de continuidad que no se

extienden más allá de la muscularis mucosae. Ninguno de estos hallazgos fueron observados ni en los colchones creados con SS+E ni en los creados con gelatina. Cabe agregar que los estudios realizados de citotoxicidad, en los que emplean fibroblastos de ratón, no muestran lesión alguna significativa con el empleo de la gelatina. [59] Por lo que se considera a ésta biocompatible. [50,51]

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- El tiempo de permanencia del colchón submucoso manteniendo un volumen mínimo de 750 mm<sup>3</sup>/ml de sustancia empleada se mantuvo en promedio entre 50 y 60 minutos con la gelatina en el modelo murino y más de 75 minutos en el modelo porcino, comparado con la SS+E que duró en promedio 6.9 y 9.1 minutos en el modelo murino y porcino respectivamente.
- El volumen del colchón obtenido con la gelatina fue 1.6 veces mayor en el modelo murino y 1.9 veces mayor en el modelo porcino inmediatamente posterior a su inyección que el conseguido con la SS+E; y 26 y 20 veces mayor a los 10 minutos de la inyección, en el modelo murino y porcino respectivamente.
- Aún cuando no se realizaron suficientes observaciones para demostrar significancia estadística referente al efecto hemostático de la gelatina posterior a la resección de la mucosa, sí se observó una clara tendencia hacia ésta.
- El efecto disector fue histológicamente evidente en los colchones creados con gelatina.
- Tanto la SS+E como la gelatina no evidenciaron datos histológicos de inflamación aguda local ni daño morfológico a túnicas adyacentes al colchón submucoso.

Éste es el primer estudio en evaluar la eficacia de la gelatina para la creación de un colchón submucoso para la resección de mucosa gástrica. Los objetivos del trabajo no pretenden suplantar las sustancias en uso clínico actual, sino explorar otros agentes para mejorar la eficacia de la resección de mucosa gástrica, debido a que no existe hasta el momento actual una sustancia que reúna en conjunto todas las características ideales de un colchón submucoso.

Existen algunas limitaciones potenciales en el estudio. Primero, presenta una muestra relativamente pequeña. Sin embargo, este trabajo fue experimental y por tanto sólo requería el número suficiente de animales para el mismo, obtenido mediante el cálculo del tamaño de muestra. Además, al emplear dos especies diferentes de animales pretendimos escalar la similitud con la anatomía humana y al mismo tiempo incrementar el tamaño de muestra. En segundo lugar, al presentar la gelatina un comportamiento absorbente dependiente de las características físico-químicas del medio externo, consideramos que los futuros estudios encaminados a replicar y ampliar los resultados actuales deben considerar los factores que puedan afectar esta capacidad absorbente, tales como el pH, la temperatura corporal, la fuerza

iónica, entre otros. Por último, consideramos necesario realizar estudios reológicos que evalúen la concentración de gelatina óptima y del disolvente previo a su inyección en tejido vivo, con la finalidad de evaluar la capacidad de gelación, la modificación de la viscosidad, la emulsificación y su habilidad para retener agua, para posteriormente crear el modelo ideal para su aplicación por vía e instrumental endoscópico.

## **PERSPECTIVAS.**

Actualmente nos encontramos trabajando en las soluciones a estos problemas, incluyendo su empleo no sólo para la resección de mucosa gástrica, sino de cualquier parte del tubo digestivo en el cual se presentan y diagnostican lesiones neoplásicas superficiales. Así como en aquellas situaciones en las que es necesario crear un colchón submucoso para resecar o retirar objetos incrustados en la mucosa intestinal. También estamos evaluando su empleo por vía endoscópica en hemorragias del tubo digestivo de difícil control con medios convencionales. Finalmente, se encuentra en fase experimental su empleo para la cirugía POEM (Per-Oral Endoscopic Myotomy) en acalasia. En este momento necesitamos más estudios para validar y ampliar los resultados actuales y evaluar esta substancia en múltiples procedimientos terapéuticos.

## **ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD**

El estudio se realizará de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio: NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## REFERENCIAS

1. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** (S.F). Recuperado el 01 de noviembre del 2014 de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
2. Lambert R, Axon A, Fujino M, et al. **Superficial Neoplastic Lesions in the Digestive Tract.** Endoscopy 2005; 37: 570-578.
3. Chung I, Lee J, Lee S, et al. **Therapeutic outcomes in 1000 cases of endoscopic submucosal dissection for early gastric neoplasms: Korean ESD Study Group multicenter study.** Gastrointest Endosc 2009; 69:1228-35.
4. Oda I, Gotoda T, Hamanaka H, et al. **Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: technical feasibility, operation time and complications from a large consecutive series.** Dig Endosc 2005; 17: 54-8.
5. Kudo S. **Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer.** Endoscopy, 1993; 25: 455–61.
6. Soetikno R, Gotoda T, Nakanishi Y, et al. **Endoscopic mucosal resection.** Gastrointest Endosc, 2003; 57: 567–79
7. Uraoka T, Fujii T, Saito Y, et al. **Effectiveness of glycerol as a submucosal injection for EMR.** Gastrointest Endosc, 2005; 61:736–40
8. Karita M, Tada M, Okita K, et al. **Endoscopic therapy for early colon cancer: the strip biopsy resection technique.** Gastrointest Endosc, 1991; 37: 128–32.
9. Tada M, Murakami A, Karita M, et al. **Endoscopic resection of early gastric cancer.** Endoscopy, 1993; 25: 445–50
10. Inoue H, Takeshita K, Hori H, et al. **Endoscopic mucosal resection with a cap-fitted panendoscope for esophagus, stomach, and colon mucosal lesions.** Gastrointest Endosc, 1993; 39: 58–62.



11. Matsuzaki K, Nagao S, Kawaguchi A, et al. **Newly designed soft pre-looped cap for endoscopic mucosal resection of gastric lesions.** *Gastrointest Endosc*, 2003; 57: 242–6.
12. Suzuki Y, Hiraishi H, Kanke K, et al. **Treatment of gastric tumors by endoscopic mucosal resection with a ligating device.** *Gastrointest Endosc*, 1999; 49: 192–9.
13. Tanaka S, Haruma K, Oka S, et al. **Clinicopathologic features and endoscopic treatment of superficially spreading colorectal neoplasms larger than 20 mm.** *Gastrointest Endosc*, 2001; 54: 62–6
14. Uraoka T, Saito Y, Matsuda T, et al. **Endoscopic indications for endoscopic mucosal resection of laterally spreading tumours in the colorectum.** *Gut*, 2006; 55:1592–7.
15. Gotoda T. **A large endoscopic resection by endoscopic submucosal dissection procedure for early gastric cancer.** *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005; 3: 71–3.
16. Ohkuwa M, Hosokawa K, Boku N, et al. **New endoscopic treatment for intramucosal gastric tumors using an insulated-tip diathermic knife.** *Endoscopy*, 2001; 33: 221–6.
17. Ono H, Kondo H, Gotoda T, et al. **Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer.** *Gut*, 2001; 48: 225–9.
18. Yamamoto H, Kawata H, Sunada K, et al. **Successful en-bloc resection of large superficial tumors in the stomach and colon using sodium hyaluronate and small-caliber-tip transparent hood.** *Endoscopy*, 2003; 35: 690–4.
19. Saito Y, Emura F, Matsuda T, et al. **A new sinker-assisted endoscopic submucosal dissection for colorectal cancer.** *Gastrointest Endosc*, 2005; 62: 297–301
20. Fujishiro M, Yahagi N, Nakamura M, et al. **Successful outcomes of a novel endoscopic treatment for GI tumors: endoscopic submucosal dissection with a mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid, glycerin, and sugar.** *Gastrointest Endosc*, 2006;63: 243–9.

21. Uraoka T, Kato J, Ishikawa S, et al. **Thin endoscope-assisted endoscopic submucosal dissection for large colorectal tumors.** *Gastrointest Endosc*, 2007; 66: 836–9
22. Cao Y, Liao C, Tan A. **Meta-analysis of endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection for tumors of the gastrointestinal tract.** *Endoscopy*, 2009; 41: 751-757
23. Yamamoto H, Kawata H, Sunada K, et al. **Successful en bloc resection of large superficial tumors in the stomach and colon using sodium hyaluronate and small-caliber-tip transparent hood.** *Endoscopy*, 2003; 35: 690-4.
24. Takizawa K, Oda I, Gotoda T, et al. **Routine coagulation of visible vessels may prevent delayed bleeding after endoscopic submucosal dissection and analysis of risk factors.** *Endoscopy*, 2008; 40:179-83.
25. Eun S, Cho J, Jung I, et al. **Effectiveness of sodium alginate as submucosal injection material for endoscopic mucosal resection in animal.** *Gut Liver*, 2007;1: 27-32.
26. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, et al. **Comparison of various submucosal injection solutions for maintaining mucosal elevation during endoscopic mucosal resection.** *Endoscopy*, 2004; 36:579–83.
27. Yamamoto H, Yube T, Isoda N, et al: **A novel method of endoscopic mucosal resection using sodium hyaluronate.** *Gastrointest Endosc*, 1999; 50: 251-256.
28. Feitoza A, Gostout C, Burgart L, et al. **Hydroxypropyl methylcellulose: A better submucosal fluid cushion for endoscopic mucosal resection.** *Gastrointest Endosc*, 2003; 57: 41-47.
29. Matsui Y, Inomata M, Izumi K, et al. **Hyaluronic acid stimulates tumor-cell proliferation at wound sites.** *Gastrointest Endosc*, 2004; 60: 539-543.

30. Tan B, Wang J, Wu Q, et al. **Sodium hyaluronate enhances colorectal tumour cell metastatic potential in vitro and in vivo.** Br J Surg, 2001; 88: 246-250.
31. Obara S, Muto H, Shigeno H, et al. **A three-month repeated oral administration study of a low viscosity grade of hydroxypropyl methylcellulose in rats.** J Toxicol Sci, 1999; 24: 33-43.
32. Bures J, Kopáková M, Kvetina J, et al. **Different solutions used for submucosal injection influenced early healing of gastric endoscopic mucosal resection in a preclinical study in experimental pigs.** Surg Endosc, 2009; 23: 2094-2101.
33. Shi Q, Zhong Y, Yao L, et al. **Endoscopic submucosal dissection for treatment of esophageal submucosal tumors originating from the muscularis propria layer.** Gastrointest Endosc, 2011; 74: 1194-1200.
34. Shastri Y, Kriener S, Caspary W, et al. **Autologous blood as a submucosal fluid cushion for endoscopic mucosal therapies: results of an ex vivo study.** Scand J Gastroenterol, 2007; 42: 1369-1375.
35. Sato T. **A novel method of endoscopic mucosal resection assisted by submucosal injection of autologous blood (blood patch EMR).** Dis Colon Rectum, 2006; 49: 1636-1641.
36. Wen W, Shi C, Shi Y et al. **A pilot animal and clinical study of autologous blood solution compared with normal saline for use as an endoscopic submucosal cushion.** Exp Ther Med, 2012; 4: 419-424.
37. Masci, E; Santoleri, L; Belloni, F. **Topical hemostatic agents in surgical practice.** Transfusion and Apheresis Science, 2011; 45: 305-311.
38. Samudrala, S. **Topical hemostatic agents in surgery: a surgeon's perspective.** AORN Journal, 2008; 88: 2-11

39. Spotnitz, WD. **Active and mechanical hemostatic agents.** Surgery, 2007;142:S34-S38
40. Duconseille A, Astruc T, Quintana N, et al. **Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review.** Food Hydrocolloids, 2015; 43: 360-376.
41. Zaman H, Beg H. **Improvement of physico-mechanical, thermomechanical, thermal and degradation properties of PCL/gelatin biocomposites: Effect of gamma radiation.** Radiat Phys Chem, 2015; 109: 73–82.
42. Hattrem M, Molnes S, Haug I et al. **Interfacial and rheological properties of gelatin based solid emulsions prepared with acid or alkali pretreated gelatins.** Food Hydrocolloids, 2015; 43: 700-707.
43. Bruckner, P. **Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules.** Cell Tissue Res, 2010; 339: 7-18.
44. Chagnot C, Listrat A, Astruc T, et al. **Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components.** Cell Microbiol, 2012; 14: 1687-1696.
45. Taheri, A, Kenari, A, Gildberg, A, et al. **Extraction and Physicochemical characterization of greater lizardfish (Saurida tumbil) skin and bone gelatin.** J Food Sci, 2009; 74: 160-165.
46. Zhou P, Regenstein J. **Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret assay.** J Food Sci, 2006; 71: 474-479.
47. Guo L, Colby R, Lusignan C, Whitesides T. **Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions.** Macromolecules, 2003; 36: 9999-10008.
48. Haug I, Drage K. **Gelatin.** Handbook of Food Proteins, 2011: 92-115

49. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, et al. **Different mixtures of sodium hyaluronate and their ability to create submucosal fluid cushions for endoscopic mucosal resection.** Endoscopy, 2004; 36: 584–9.
50. Giday S, Magno P, Buscaglia J, et al. **Is blood the ideal submucosal cushioning agent? A comparative study in a prospective model.** Endoscopy, 2006;38:1230-4
51. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, et al. **Tissue damage of different submucosal injection solutions for EMR.** Gastrointest Endosc, 2005; 62:933–42.
52. Uraoka T, Saito Y, Yamamoto K, et al. **Submucosal injection solution for gastrointestinal tract endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection.** Drug Des Devel Ther, 2008; 2:131-138
53. Kato M, Nakajima K, Yamada T, et al. **Next Generation Esophageal ESD Under Steady Pressure Automatically Controlled Endoscopy (SPACE): a Clinical Feasibility Study.** Gastrointes Endosc, 2013;77: 153
54. Pioche M, Ciocirlan M, Lepilliez V, et al. **Gastric Endoscopic Sub-Mucosal Dissection With a New Water Jet System Allowing Injection of Macromolecular Solution: First Evaluation on Pig’s Stomach Model.** Gastrointes Endosc, 2013;77: 188
55. Parra-Blanco A, Uraoka T, Ortiz J, et al. **Is a Traction Method (Clip-Band) Useful to Facilitate Gastric Endoscopic Submucosal Dissection? A Prospective, Randomized, Controlled Trial in a Live Porcine Model.** Gastrointes Endosc, 2013; 77:123
56. Kato M, Yamasaki M, Hirota M, et al. **“Tornado ESD”: a Novel Endoscopic Technique With Robust and Adjustable Tissue Traction.** Gastrointes Endosc, 2013; 77:188.
57. Goto O, SchöLvinck D, Bergman J, et al. **An Endoscopic Grasp-and-Traction Device Is Helpful for Gastric Endoscopic Submucosal Dissection in the Forward, but Not**

- in the Retroflex Approach: an Ex-Vivo Comparative Study on the Usefulness of ENDOLIFTER®.** *Gastrointes Endosc*, 2013;77:193
58. Lenz L, Di Sena V, Nakao F, et al. **Comparative results of gastric submucosal injection with hydroxypropyl methylcellulose, carboxymethylcellulose and normal saline solution in a porcine model.** *Arq Gastroenterol*, 2010; 47: 184-187.
59. Kabiri M, Hojjati S, Rafinia M, Tahrir M. **Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications.** *Current Applied Physics*, 2011; 11: 457-461.
60. Sumiyoshi T, Fujii T, Sumiyoshi Y, et al. **Injected substances to the submucosa in endoscopic mucosal resection: glycerin solution versus normal saline solution.** *Gastrointest Endosc*, 2002; 55: 110.
61. Chong E, Phan T, Lim I, et al. **Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution.** *Acta Biomater*, 2007; 3: 321–330.