

2014

TESIS DOCTORAL

Dr. SEVERINO REY NODAR

QUERATOPIGMENTACION:
HISTOPATOLOGIA, TOXICIDAD,
REACTIVIDAD BIOLOGICA. ESTUDIO
EXPERIMENTAL



Departamento de Patología y Cirugía
Universidad Miguel Hernández
3/1/2014



Te:

**QUERATOPIGMENTACION: HISTOPATOLOGIA,
TOXICIDAD, REACTIVIDAD BIOLOGICA. ESTUDIO
EXPERIMENTAL**

Tesis realizada por el Dr. Severino Rey Nodar en el departamento de Patología y Cirugía de la Escuela de Medicina, bajo la dirección del Prof. Dr. Jorge Alió, para optar por el título de Doctor en Medicina y cirugía por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Doctorando:

Alicante, Marzo 2014



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y CIRUGIA

QUERATOPIGMENTACION: HISTOPATOLOGIA,
TOXICIDAD, REACTIVIDAD BIOLOGICA. ESTUDIO
EXPERIMENTAL

AUTOR.
DR. SEVERINO REY NODAR

DIRECTOR.
Prof. Dr. Jorge Alió
Director Departamento de Patología y Cirugía
Universidad Miguel Hernández
Presidente Vissum Corporation

ELX, ALICANTE
2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos mis compañeros que durante todo el proceso de investigación y formación me han apoyado, estimulado y guiado. En especial a la Srta. Mercedes Escolano, técnica de anatomía patológica, quien sin su trabajo especializado no hubiese sido posible este trabajo.

A la Lic. Alejandra Rodríguez, por su cooperación con la bibliografía, comprensión y asistencia profesional oportuna.

A todos los compañeros del Instituto Vissum Alicante por su aportación y acogida.

A mis padres por transmitirme desde muy pequeño toda su ilusión y apoyo. Ellos han sido un firme testimonio para nunca bajar los brazos.

A todos, muchas gracias.



*Después de escalar una montaña muy alta,
Descubrimos que hay muchas otras montañas
por escalar.*

NELSON MANDELA

INDICE GENERAL

1- Introducción.....	1
1.1- Historia de la queratopigmentación.....	1
1.2- Selección de colores según demostró Ziegler.....	6
1.3- Indicaciones y su historia según la describe Ziegler.....	11
1.4- Indicaciones para el tatuaje óptico.....	11
1.5- Contar indicaciones según estudio de Ziegler.....	11
1.6- Preparación preliminar para la Operación.....	13
1.7- Pigmentos. La micronización.....	14
1.8- Cicatrización y reparación de daños a la cornea.....	19
1.9- Biocompatibilidad.....	26
2- Justificación.....	28
3- Hipótesis.....	30
4- Objetivos del trabajo.....	32
5- Material y métodos.....	34
5.1- Experiencia ex vivo.....	34
5.2- Estudio experimental en un modelo animal con QTP.....	44
5.2.1- Material.....	44
5.2.2- Métodos.....	47
5.2.3- Procedimiento quirúrgico.....	48
5.2.3.1- Técnica de QTP intraestromal manual.....	49
5.2.3.2- Técnica de QTP intraestromal asistida por láser femtosegundo.....	55
5.2.3.3- Tinción corneal intraestromal (ICS).....	57
5.2.3.4- Tinción corneal superficial (TCS).....	60
5.2.3.5- Variables principales y seguimiento.....	63
6- Resultados.....	67
6.1- Descripción.....	67
6.2- Resultados del examen histopatológico.....	68
6.3- Resultados del examen microscópico confocal.....	88

7- Discusión.....	95
8- Conclusiones.....	114
9- Bibliografía.....	118
Anexos.	



I- INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras.

1- Figura 1- Galeno.....	2
2- Figura 2 - Anillo pupilar de Armaignac.....	5
3- Figura 3 - Paleta de pigmentos.....	8
4- Figura 4 - Esquema general del micronizador.....	18
5- Figura 5- Análisis comparativo de la distribución de partículas entre un pigmento micronizado y otro no micronizado.....	19
6- Figura 6- Imagen histológica de córnea normal.....	20
7- Figura 7- Microfotografía de una herida penetrante de la córnea. Invaginación y crecimiento del epitelio hacia el estroma	24
8- Figura 8- Microfotografía de una herida penetrante de la córnea por un cristal	24
9- Figura 9- Arriba. Color de los pigmentos para tatuaje corneal. Abajo. Ojos de cerdos (enucleación). Aspecto macroscópico con QTP central y periférica.....	36
10- Figura 10- Prueba de profundidad de las agujas en ojos de cadáver de cerdo.....	38
11-Figura 11- Microfotografías de cortes histológicos a distintas profundidades con diferentes agujas	38-40
12-Figura 12- Análisis de profundidad/ tipo de aguja empleada en QTP.....	41
13-Figura 13- Pupila +limbo corneal negro (izq). Pupila + limbo corneal negro Iris (der)	42
14- Figura 14-. Imagen macroscópica de azul cobalto + gris claro (izquierda) y derecha azul cobalto + gris claro y gris oscuro.....	42
15- Figura 15- Fondo de iris azul cobalto (NCH11) con 5S.....	43
16- Figura 16- Izq. Iris intraestromal manual con blond 5. Der. Iris intraestromal manual con marrón 492.....	44
17- Figura 17- Conejo de raza albina.....	45
18- Figura 18- Procedimiento de eutanasia en quirófano y extracción de globos oculares en estabulario UMH....	45
19-Figura 19-Instrumental necesario para aplicar pigmentos en QTP(tunelizador derecho e izquierdo, Disector curvo,etc.....	51

20- Figura 20- Pigmentación intraestromal manual. Uso de varios colores.....	52
21- Figura 21- Ilustración que demuestra la impregnación del Pigmento mediante la técnica TCI.....	57
22- Figura 22- Equipo stylus 3 con puntas 5S. Potencia 3.5-4.....	58
23- Figura 23. Agujas de Micropunción stylus.....	59
24- Figura 24. Representación esquemática de los tipos de queratopigmentación.....	60
25- Figura 25. -. Conejos con QTP central y periférico 2 horas después de habersele realizado QTP. Derecha tipo central pupilar. Izquierda tipo periférica.....	61
26- Figura 26- QTP periférica (Iris)	61
27- Figura 27. Vista de acercamiento de ojo de Conejo albino con queratopigmentación periférica con pigmento micronizado de color negro.....	62
28- Figura 28. QTP Central (Pupilar) Aspecto macroscópico.....	62
29- Figura 29- Vista de acercamiento de QTP central.....	63
30- Figura 30-Vista panorámica de un corte histológico de córnea un conejo 3 meses después de haberle realizado la queratopigmentación. Tinción de Hematoxilina.....	73
31- Figura 31- QTPA-2. Presencia de pigmento en el estroma Corneal. No se observó neovascularización. HE.....	74
32- Figura 32- QTPB5. Presencia lineal del pigmento en el estroma corneal. No se observa dispersión.....	75
33- Figura 33- QTP intraestromal. Sección histológica de la córnea de un conejo albino a los 3 meses postqueratopigmentación.....	76
34- Figura 34-QTPB9 Presencia de inflamación crónica leve (Grado 1) El pigmento negro permanece en cantidad adecuada y estable.....	77
35- Figura 35- QTPD4. Corte histológico de córnea con inflamación aguda leve focal en la cámara posterior del ojo muy cercana al limbo.....	78
36- Figura 36. Microfotografía de acercamiento de tatuaje intraestromal	79
37- Figura 37- Corte histológico teñido con hematoxilina-eosina. Ojo control QTPA6.....	80
38- Figura 38- Corte histológico de la córnea del ojo control. Tatuaje central	81

39- Figura 39- QTPD8. Estroma corneal a los 6 meses de haber realizado la QTP intraestromal.....	82
40- Figura 40-QTPC7 Presencia de leve infiltrado linfocítico en el estroma.....	83
41- Figura 41- QTPB3 -3 meses después de la QTP.....	84
42- Figura 42-Tricrómico de Masson (QTPB9).....	85
43- Figura 43- Tinción de Azul Alcian. No existen cambios en la matrix estromal.....	86
44- Figura 44- Tinción de Tricrómico de Masson (QTPB1)...	86
45- Figura 45-Tricrómico de Masson. Microfotografía del ojo 4 del grupo C.....	87
46- Figura 46-Tinción inmunohistoquímica con anticógeno I, el predominante en el estroma corneal.....	87
47- Figuras 47-50-Imágenes de tomografías decoherencia óptica estroma profundo y superficial con y sin pigmento (Control).....	90
48- Figura 51-Tomografía de coherencia óptica. Estroma corneal medio con pigmento(visto mediante una alta reflectividad de la luz).....	91
49- Figura 52- Tomografía de coherencia óptica.Endotelio corneal (alta reflectividad del pigmento en el estroma medio.).....	92
50- Figura 53- Tomografía de coherencia óptica. Epitelio corneal (ojo tatuado).....	92
51- Figura 54- Tomografía de coherencia óptica. Estroma anterior (ojo tatuado)	93
52- Figura 55- Fotografía de ojos de conejos con QTP periférica a los 3 meses (izq) y a los 6 meses (Der) con la excelente permanencia del pigmento negro.....	102
53- Figura 56- Micropigmentación central. Foto Izquierda tomada a los 3 meses post QTP y la de la derecha a los 6 meses postcirugía.....	102

Tablas.

1-Tabla 1A- Paleta de pigmentos con su composición.....	9
2-Tabla 1B- Tonos de color del iris y pigmentos necesarios...	10
3-Tabla 2 - Variación de parámetros histológicos según grupo de conejos.....	71



I- ABREVIATURAS

QTP: Queratopigmentación

Comentado [G1]: QTP??

QP: Queratoplastia

Comentado [G2]: QP??

QTPP: Queratoplastia penetrante

Comentado [G3]: Faltaría esta abreviatura

QLAP: Queratoplastia lamelar anterior profunda

Comentado [G4]: QTPP??

RP: Retinopatía de la prematuridad

RD: Desprendimiento de retina

APL: Ausencia de percepción a la luz

MM: Movimientos de la mano

TCI: Tinción corneal intralamelar

Comentado [G5]: Faltaría añadir esta abreviatura

TCS: Tinción corneal superficial

TCI??

Comentado [G6]: Idem anterior

TCS???

**RESUMEN/
ABSTRACT**



RESUMEN

Este es el primer artículo sobre la práctica de la QTP con pigmentos micronizados minerales, y también sobre el uso de la QTP intrastromal con resultados estables.

Diseñamos un estudio experimental con conejos de raza albina y cerdos que fueron sometidos a queratopigmentación. Hemos descrito el uso combinado de dos abordajes quirúrgicos; ya sea tiñendo la superficie corneal anterior (TCS) o introduciendo el pigmento directamente en el estroma corneal (TCI).

Consideramos que la QTP o el tatuaje corneal utilizando pigmentos micronizados minerales se puede considerar como una alternativa compasiva para los pacientes en los que la evisceración o las prótesis de otro modo se utilizarían para mejorar el aspecto cosmético. El tatuaje corneal puede ser un procedimiento utilizado para la corrección a largo plazo o permanente de las deformidades cosméticas del ojo en pacientes con cicatrices corneales desfigurantes. Durante el seguimiento de este estudio se ha demostrado que el procedimiento es relativamente fácil, seguro y de larga duración, y los resultados confirman que en córneas tatuadas, el pigmento se mantiene considerablemente estable durante largos períodos de tiempo.

En todos nuestros animales experimentales se realizó examen con microscopia confocal y estudio histopatológico. Los resultados demostraron claramente que los pigmentos estaban perfectamente localizados y que se limitaban a la zona del tatuaje, lo que puso de manifiesto que la fijación de los pigmentos era excelente, sin signos

evidentes de dispersión o migración no deseada, ya sea a nivel superficial o de profundidad, incluso en el plano horizontal de la ubicación de los pigmentos.

No se reportó toxicidad local ni sistémica ni complicaciones. El estudio histológico de las córneas no demostró neovascularización, fibrosis, y la inflamación fue focal y leve en solo tres ojos.

Asimismo, consideramos que con este moderno examen podríamos esperar resultados preliminares. Finalmente, la intervención con QTP podría ser útil para grupos de pacientes bien seleccionados, tanto para fines cosméticos como para fines terapéuticos.



ABSTRACT

This is the first article on the practice of KTP with mineral micronized pigments, and also on the use of intrastromal KTP with stable results. We designed an experimental study with rabbits and pigs bred albino who underwent keratopigmentation. We have described the combined use of two surgical approaches, either the anterior corneal surface staining (SCS) or introducing the pigment directly into the corneal stroma (ICS).

We believe that the KTP or corneal tattooing using mineral micronized pigments may be considered as an alternative for patients compassionate where prostheses evisceration or otherwise be used to improve the cosmetic appearance. The corneal tattoo can be a correction procedure used for long term or permanent eye cosmetic deformity in patients with corneal scars disfiguring. During the follow up this study has shown that the procedure is relatively easy, safe and long lasting, and the results confirm that tattooed corneas, the pigment remains substantially stable for long periods of time.

In all our experimental animals was performed confocal microscopy examination and histopathology. The results clearly showed that the pigments were perfectly localized and limited to the area of the tattoo, which showed that the fixation of pigments was excellent, with no signs of dispersion or unwanted migration, either at the surface or deep, even in the horizontal plane of the location of the pigments.

No local or systemic toxicity reported no complications. Histological examination of the corneas showed no neovascularization, fibrosis, and

inflammation was focal and mild in only three eyes.

We also believe that with this modern examination might expect preliminary results. Finally, the KTP intervention could be useful for selected patients groups, both for cosmetic and therapeutic purposes.



INTRODUCCION



INTRODUCCION

1 - INTRODUCCIÓN

1-1 Historia de la queratopigmentación

La práctica del tatuaje corneal (queratopigmentación, QTP) no es ni mucho menos una práctica nueva. De hecho, ya en la antigüedad lo practicaban de forma muy rudimentaria y durante siglos se ha utilizado esporádicamente para el tratamiento de las opacidades corneales ^(1,2). Galeno ⁽¹⁾ Figura- 1 (131-210 A.D.) fue el primero en describir el procedimiento y se considera que es el primer médico que pigmentó una córnea humana utilizando sulfato de cobre reducido con agalla para enmascarar un leucoma corneal de aspecto cosméticamente desagradable ⁽³⁾. Posteriormente lo hizo Aetius en el año 450 A.D. Se necesitaron catorce siglos para que un técnico práctico, De Wecker, diseñara, utilizara y llevara a la práctica el método moderno del procedimiento. Manifestó que la sugerencia en realidad se consideró cuando un estudiante suyo formuló una pregunta en su momento sobre el posible tratamiento de un caso clínico (signo de Abadie) ⁽⁴⁾. Los detalles de estas técnicas y procedimientos de dicho estudiante fueron publicadas por el jefe de la clínica, Pomier ⁽⁴⁾ de Pau, en 1870. En 1872, De wecker reintrodujo el mismo principio pero con la aplicación mecánica de la tinta india ⁽⁴⁾. Posteriormente, la queratopigmentación ganó popularidad, y muchos autores a finales de 1870 y principios de 1900 sugirieron diferentes indicaciones y el uso de una variedad de colorantes, dispositivos y métodos de aplicación ⁽¹⁾.



Figura: -1 Galeno ⁽¹⁾.

Los primeros ensayos de los procedimientos estaban limitados al uso de tinta negra o tinta india, que los autores solían utilizar para rellenar la zona de la pupila y también para delinear el círculo del iris y, en ocasiones, para puntear las partes radiales del iris. Durante la década siguiente, otros autores como Dunnage ⁽⁴⁾, Taylor ⁽⁵⁾, Woinow ⁽⁴⁾ Hasner ⁽⁴⁾ y Archer ⁽⁴⁾ en Europa, y Levis ⁽⁴⁾, Williams ⁽⁴⁾, Thomson ⁽⁴⁾ y Mathewson ⁽⁴⁾ en Norteamérica intentaron realizar el tatuaje con pigmentos multicolor para imitar el estroma natural del iris, obteniendo un importante éxito.

La aportación de Taylor atrajo más la atención, en comparación con otras aportaciones, principalmente debido a que abogaba por el uso de manojos de agujas, que de Wecker consideró que era mucho más práctico y eficiente que utilizar su propia aguja única acanalada, por lo que no tardó en adoptar la sugerencia de Taylor.

Es interesante mencionar que Levis, de Filadelfia, fue el primer norteamericano que defendió y puso en práctica el tatuaje con colores ⁽⁴⁾. Archer, en Utrecht, llevó a cabo en 1874 un exhaustivo y valioso estudio

sobre la variedad de pigmentos de colores. Su investigación la realizó en tres direcciones: 1. La Fijación de los colores. 2. Las modificaciones que se produjeron en el tejido corneal. 3. La distribución real que se produce en las partículas dispersas del pigmento. ⁽⁴⁾ Encontró goma guta (*gamboge*; que es una resina de color marrón naranja que proviene de varios árboles del género *Garcinia* y que se vuelve amarilla cuando se transforma en polvo. Los artistas la utilizan como un pigmento amarillo y en medicina como un catártico), siendo tan irritante que se solía producir inflamación y exfoliación poco después de utilizarla, lo que, consecuentemente, expulsaba a este pigmento del tejido corneal.

Las tintas de color azul ultramarino, tierra de Siena y la tinta india se toleraron mejor, aunque el color azul índigo o azul de Prusia resultaron más irritantes. Durante la década siguiente, no se aportó nada notable sobre este tema, pero en 1887 Vacher, de Orleáns, presentó un artículo de valor práctico en el que enfatizó la importancia de que sería mejor utilizar material colorante que fuese químicamente puro, estable y que estuviese reducido a un polvo muy fino y pequeño. Utilizó cinco pigmentos diferentes: carbonato de calcio, carmín, azul de Prusia, ocre pálido y tinta India ⁽⁴⁾.

Más tarde, se realizaron estudios y se elaboraron artículos sobre los estudios presentados por investigadores como Nieden ⁽⁴⁾ de Bochum,

Coffer ⁽⁶⁾ de Trieste, Holth ⁽⁴⁾ de Cristiania y Polack ⁽⁴⁾ de París, que enriquecieron enormemente el conocimiento práctico sobre este tema.

En 1901, Nieden de Bochum utilizó el diseño principal y la idea de una pluma fuente o estilográfica e inventó una aguja de tatuaje que se utilizaría con el bolígrafo eléctrico creado por Edison. Este pequeño invento le dio a Merck la idea de extraer un pigmento marrón de la coroides de un buey, para lo que se necesitaron 26 ojos para producir 232 miligramos de este pigmento marrón. Se encontró que este pigmento uveal era difícil de obtener, muy caro y que no ofrecía ninguna ventaja, de manera que rechazó el uso de la goma guta. También manifestó que no se obtuvo ningún éxito con el uso de colores como el tierra Siena, el sepia, el tierra de sombra tostada y el ocre marrón, debido a la irritación y extrusión que causaban estos colores de pigmentos. En algunas personas resultó satisfactorio, y el ocre podía ser su pigmento También apoyó discretamente el uso del azul ultramarino y el azul de Prusia ⁽⁴⁾.

En el año 1902, Cofler elaboró colores japoneses en forma de bastoncillos que consiguió en Tokio. Estos colores fueron: Azul, Marrón, Rojo y Amarillo. También descubrió que el cinabrio y el azul cerúleo o celeste eran insolubles, inocuos y que no contenían bacterias. Obtuvo un maravilloso éxito al mezclar cinabrio con tinta India, con lo que pudo crear todos los matices del marrón, y también obtuvo un éxito asombroso al mezclar el azul cerúleo o celeste con negro y marrón, cuyo resultado se asemejaba mucho al estroma del iris ⁽⁴⁾

Holth fue persistente y muy ingenioso con el desarrollo de esta técnica. En 1898 comenzó a utilizar cilindros de metal y punzones

tubulares como trépanos corneales para ser más exactos con el delineado de los márgenes de la pupila y el círculo exterior del iris.

Él manifestó su prioridad en este aspecto, en comparación con Armaignac ⁽⁴⁾, quien a tal fin utilizaba una guía larga y pequeña en forma de embudo (Fig. 2) que tenía tres salientes para fijar la córnea. Reconoció que Czermak ⁽⁴⁾ había utilizado previamente (1896) el trépano de von Hippel para delinear la pupila. Realizó un raspado en el epitelio de la zona pupilar propuesta antes de tatuarla con pigmento, que mezcló con una suave solución de goma arábica como vehículo ⁽⁴⁾.

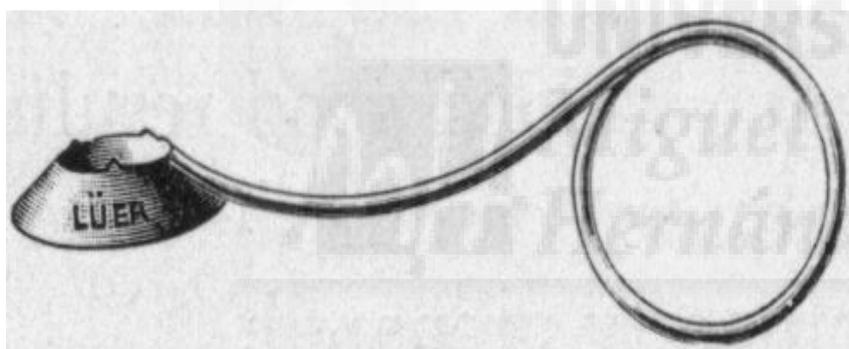


Figura:- 2.- Anillo pupilar de Armaignac ⁽⁴⁾.

En 1906 Holth dejó de utilizar los colores de los bastoncillos japoneses y comenzó a utilizar los colores franceses que aclaraba con agua, alcohol y éter para eliminar las impurezas oleosas y resinosas, de manera que los pigmentos resultasen ser unos polvos imperceptibles y estériles sin componentes irritantes. Holth utilizó los colores negros de humo, cinabrio, sepia, azul ultramarino, y azul celeste (estaminato de cobalto), en polvo, carbonato de calcio, tierra gris y arcilla blanca. A

Holth no le gustaban los pigmentos de color tierra gris, azul ultramarino, azul de Brunswick, azul mineral, azul de Prusia, azul de montaña y amarillo cadmio. Debido a que el color verde tierra y el azul ultramarino habían dado buenos resultados en manos de otros cirujanos, es muy posible que los productos disponibles con los que él contaba no se hubieran elaborado apropiadamente ⁽⁴⁾. A través de sus pruebas y estudios, Chevallereau y Polack observaron que la mejor paleta de colores, incluso a pesar de que los matices eran mayoritariamente marrones, era realmente más que necesaria. Manifestaron que esto realmente representaba una ventaja, ya que la mayoría de los médicos no son artistas, pero olvidan que el estudiante de hoy debe estar muy familiarizado con los colorantes microscópicos y, por tanto, tener un amplio conocimiento sobre los matices de los colores. Los matices del azul son limitados, pero con una hábil mezcla de los pigmentos en su paleta remediaron fácilmente este defecto. Habían probado muchos otros pigmentos, pero se dieron por vencidos. En 1906 hubo un anuncio sobre los pigmentos de color y cuáles se podían utilizar sin riesgo. Ziegler et al. probaron personalmente todos estos pigmentos y muchos más, estableciendo que su paleta se podía adaptar sin riesgo alguno ⁽⁴⁾.

1-2 Selección de colores según demostró Ziegler

Cuando se eligen los colores, se deberían escoger pigmentos cuyo origen sea mineral, indelebles, fáciles de esterilizar, no irritantes para la córnea, opacos a los rayos luminosos y mezclable con agua, pero no solubles. Los colores minerales son más permanentes que los colores vegetales cuando se aplican al tejido humano, pero es obvio que son pigmentos irritantes ⁽⁴⁾.

Hay pigmentos que no se deberían utilizar como, por ejemplo, el cromo, el cadmio, el cobalto y la goma guta, y también se deberían mantener lejos de sustancias químicas como el oxicianuro o el bicloruro de mercurio, ya que son peligrosas cuando se mezclan con pigmentos. Se trata de pigmentos franceses que no cambian de color o consistencia cuando se esterilizan y no deberían causar irritación cuando se introducen en la córnea. El color del pigmento debería coincidir con el color del iris o podría ser un poco más fuerte, ya que es posible que se aclare un poco tras ser inyectado en la córnea ⁽⁴⁾. Tal y como demostró Hamilton ⁽⁴⁾, la presencia de una cápsula de bacilo en las tintas chinas acentúa la necesidad de esterilización. Esto es difícil con la forma en bastoncillo, ya que se funde en grandes grumos en presencia de calor húmedo y se agrieta y endurece en presencia de calor seco, de manera que no puede transformarse en polvo.

Los pigmentos franceses en polvo fino pueden resistir mejor la esterilización en un esterilizador seco a una temperatura de hasta 150°C, sin que experimenten un cambio de color o consistencia, y no deberían irritar la córnea cuando se apliquen. El pigmento debe ser lo suficientemente opaco para oscurecer el leucoma o para interceptar los rayos luminosos en albinos, o en presencia de coloboma y queratocono. Como regla general, el colorante debería coincidir con el color del iris o ser un poco más fuerte, ya que es posible que se produzca una dispersión del pigmento tras introducirlo en el tejido corneal - (a) mediante extrusión repentina, a través de una inflamación producida por irritación con sustancias químicas; (b) mediante una lenta migración, y (c) mediante solución parcial ⁽⁴⁾.

De acuerdo con Browicz ⁽⁴⁾, Hirschberg ⁽⁴⁾ y Poncet ⁽⁴⁾, dichos depósitos forman aglutinaciones fusiformes o irregulares en las células, vasos y espacios interfibrilares y linfáticos y suelen penetrar en las capas más profundas del epitelio y del estroma de la córnea. Alt ⁽⁴⁾, Parsons ⁽⁴⁾, Terrien ⁽⁴⁾, entre otros, confirmaron estas observaciones. Para realizar una presentación gráfica de la paleta de pigmentos (Fig. -3), de su composición química y de las combinaciones necesarias para obtener el tono deseado de color del iris, Ziegler elaboró las siguientes tablas (1A -1B):

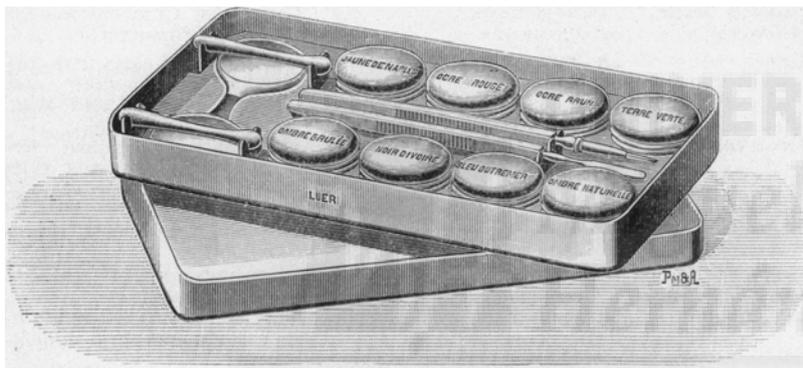


Figura:-3. Paleta de pigmentos ⁽⁴⁾

NOMBRE CASTELLANO DEL PIGMENTO	NOMBRE INGLÉS DEL PIGMENTO	NOMBRE FRANCÉS DEL PIGMENTO	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PIGMENTO
Amarillo Nápoles	Naples yellow	Le Jaune de Naples	Carbonato de plomo calcinado, biantimoniato de potasio, cloruro de amonio, y alumbre seco.
Verde tierra	Green herat	La Terre Verte	Carbonato de hidrato de cobre, con sales hidratadas de aluminio, hierro, y manganeso.
Azul ultramarino	Ultramarine blue	Le Bleu d'Outremer	Azufre, sodio y silicato de aluminio.
Marrón ocre Rojo ocre	Brown ochre Red ochre	L'Ocre Brun L'Ocre Rouge	Arcilla que contiene óxidos de hierro y manganeso
Tierra de sombra natural	Raw umber	La Terre d'Ombre Naturelle	Arcilla que contiene silicio, aluminio, óxido de hierro y manganeso.
Tierra de sombra tostada	Burnt umber	La Terre d'Ombre Brule'e	Tierra de sombra tostada calcinada, según se describe arriba.
Negro marfil	Ivory black	Le Noir d'Ivoire	Negro hueso calcinado.

Tabla (1- A) Paleta de pigmentos con su composición ⁽⁴⁾.

TONO DE COLOR DESEADO	PIGMENTOS, SOLOS O COMBINADOS
Amarillo (para mezclar o para oscurecer)	Amarillo Nápoles
Verde claro (verde mar) o azul verdoso	Verde tierra
Azul claro	Azul ultramarino, más amarillo Nápoles
Azul oscuro	Azul ultramarino
Marrón claro o amarillo	Marrón ocre
Marrón amarillo, teñido de verde	Marrón ocre, más verde tierra
Marrón rojo	Rojo ocre
Marrón medio	Tierra de sombra natural
Marrón medio, teñido de verde	Tierra de sombra natural, más verde tierra
Marrón oscuro	Tierra de sombra tostada
Marrón muy oscuro	Tierra de sombra tostada o rojo ocre, más negro marfil
Pupila negra (círculo y partes radiales del iris)	Negro marfil (o tinta India)

Tabla (1-B)- Tonos de color del iris y pigmentos necesarios ⁽⁴⁾.

Además, Ziegler describió que el Amarillo Nápoles es un pigmento que es más útil que el blanco zinc para corregir un error, ya que permite cubrir un error mediante el procedimiento de tatuaje con color. El pigmento Tierra Verde no es un pigmento tan estable como debería ser, aunque puede ser muy útil con la mayoría de los colores cuando se mezcla de la forma correcta. Cuando el color verde tierra se añade al color marrón, parece crear un aspecto más natural. El Rojo Ocre se puede mezclar con el negro marfil para crear casi cualquier tono de marrón ⁽⁴⁾.

1-3 Indicaciones, la historia de las indicaciones según la describe Ziegler

El objetivo principal del tatuaje corneal es uno de los dos motivos. Se ideó con fines cosméticos u ópticos⁽⁴⁾.

- Indicaciones para el tatuaje cosmético según el estudio de Ziegler:

- 1- Leucoma no adherente.
2. Leucoma adherente, sólo en caso de que el iris no esté expuesto.
3. Queratitis cicatricial, para reducir la úlcera.
4. Leucomatosa vascular, sólo en caso de que esté controlada con adrenalina.
5. Ptisis bulbi, tras tenotomizar los músculos rectos para producir exoftalmosis compensadas (De Wecker).
6. Para disimular la catarata en la pupila, en caso de que no se pueda operar.

1-4 – Indicaciones para el tatuaje óptico (4):

1. Albinismo, pero no en la pupila central.
2. Aniridia.
3. Coloboma.
4. Iridodiálisis.
5. Queratocono.
6. Para la opacidad difusa de la córnea que produce deslumbramiento o ceguera corneal.

1-5 –Contraindicaciones según el estudio de Ziegler (4):

1. Leucoma adherente ya existente (en caso de que el iris esté expuesto).

2. Iridociclitis con globo ocular desorganizado.
3. Estafiloma.
4. Algunos casos de glaucoma.
5. Algunos casos de irritación o inflamación simpática.
6. Depósito calcáreo.
7. Queratitis cicatricial.
8. Enfermedad lacrimo-nasal.
9. Conjuntivitis crónica ⁽⁴⁾.

En 1872, De Wecker puso primeramente el énfasis en la necesidad de realizar tatuaje óptico en los casos de opacidad corneal, la cual, debido a su translucidez, es probable que transmita imágenes borrosas, siendo el contraste que producen las imágenes borrosas y claras lo que crea confusión visual debido a la falta de definición. No obstante, se demostró que algunos problemas como la visión borrosa y la difusión de rayos dispersos producían deslumbramiento al paciente. Para resolver esto, De Wecker realizó una pupila estenopeica hacia abajo y hacia adentro, y cubrió la córnea central con pigmento negro opaco ⁽⁴⁾.

En 1907, Mayeda ⁽⁴⁾ de Nagoya, Japón, realizó algunos experimentos con el negro opaco y demostró gráficamente este hecho en 1907 utilizando una lente Zeiss "unaria" con un diafragma del iris de 15 mm y realizó los siguientes experimentos fotográficos, para lo que primero untó la lente de la cámara con una pasta y luego cubrió la pasta con negro opaco:

1. Objetivo de cámara sencillo = imagen clara.
2. Pasta translúcida en la mitad inferior de la lente = imagen borrosa.

3. La misma pasta translúcida cubierta con negro opaco = imagen clara.
4. Centro de 10 mm de pasta translúcida = imagen borrosa.
5. La misma pasta translúcida cubierta con negro opaco = imagen clara.
6. Centro de 8 mm de negro opaco rodeado de una zona de 1 mm de pasta translúcida = imagen borrosa.
7. Centro de 8 mm (negro) con una zona de pasta translúcida cubierta de negro opaco = imagen clara.

Cuando aplicó el negro opaco, la definición volvió a ser normal. Más tarde afirmó que al estudiar unos 30 casos singulares de opacidad corneal, el tatuaje había mejorado la visión, siendo ésta entre 2 y 10 veces mejor que antes de tatuar la opacidad corneal. Cuando se realiza el procedimiento de tatuaje de la córnea o del globo ocular, los pasos a seguir son los siguientes (Preparación preliminar para la Operación, Preparación inmediata para la Operación según describió Ziegler ⁽⁴⁾)

1-6 –Preparación preliminar para la Operación

El buen juicio indicaría que cada contraindicación se tenga en cuenta y descarte antes de intentar realizar el tatuaje. En caso de conjuntivitis crónica, se debería instaurar tratamiento activo. Si el conducto lagrimal presenta algún fallo, se debería realizar una dilatación rápida al menos dos semanas antes del tatuaje. En caso de leucoma adherente, se debería realizar sinequiotomía o iridectomía. Si la córnea es vascular, se deberían obliterar los vasos sanguíneos tocándolos con la punta del galvanocauterizador y esperar hasta que se haya producido la cicatrización total.

La aplicación de un lápiz de nieve de dióxido de carbono durante dos segundos tendrá un efecto similar. Algunas veces, basta con utilizar adrenalina para alcanzar temporalmente este objetivo, mientras que las punciones con la aguja y la introducción de pigmentos tienden a obliterar los vasos. Debido a que los depósitos calcáreos son muy molestos, se debería recurrir al raspado y a la cauterización. Si el estafiloma es susceptible de ser intervenido, se debería extirpar mediante queratectomía y se debería dejar que la herida corneal se endurezca durante al menos seis meses y posiblemente un año.

Comprobé que la sugerencia de Pontius 27 de utilizar libremente adrenalina (1: 1000) a fin de fortalecer y regenerar la córnea debilitada era valiosa en mis manos. Esto es particularmente aplicable en los casos de Estafiloma agudo y Queratocono agudo.

1-7 – Pigmentos. La micronización.

Un pigmento es un material que cambia el color de la luz que refleja como resultado de la absorción selectiva de las ondas de luz. Este proceso físico es diferente a la fluorescencia, la fosforescencia y otras formas de luminiscencia, en las cuales el propio material emite luz.

Muchos materiales selectivamente absorben ciertas ondas de luz, dependiendo de su longitud de onda. Los materiales que a lo largo de la historia se han elegido y producido para ser utilizados como pigmentos, por lo general, tienen propiedades especiales que los vuelven ideales para colorear otros materiales. Un pigmento debe tener una gran capacidad de teñir relativa a los materiales que colorea. Además debe ser estable en forma sólida a temperatura ambiente.

Los pigmentos son compuestos coloreados que se aplican utilizando suspensiones, en las que se encuentran como finas partículas (tintas y pinturas, por ejemplo). Los pigmentos suelen tener mayor opacidad, poder cubriente y resistencia al calor que los colorantes. Los pigmentos pueden ser compuestos inorgánicos u orgánicos.

Las características que tienen que tener los pigmentos son:

- Color
- Adherencia al vehículo que lo transporta.
- Resistencia a la luz.
- Resistencia al calor.
- Resistencia a los disolventes orgánicos, al agua, a los ácidos y a los álcalis.
- Resistencia al sangrado (por solubilidad parcial en el vehículo que se utiliza) y a la floculación (formación de agregados que precipitan).
- Nivelado (uniformidad del color en una superficie amplia).
- Debe ser inocuo para el sustrato.

CLASIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS.

Los pigmentos se pueden genéricamente catalogar en dos tipos:

- **PIGMENTOS NATURALES (DE TIPO ORGANICO e INORGANICO).**
- **PIGMENTOS SINTÉTICOS O QUÍMICOS.** Obtenidos para abaratar los costes de ciertos pigmentos naturales. Su origen puede ser tanto orgánico como inorgánico, pero al final siempre son tratados

químicamente. Actualmente muchos de ellos se fabrican a partir de derivados del petróleo y del carbono.

LOS PIGMENTOS ORGÁNICOS (procedentes de animales)

Los pigmentos orgánicos son aquellos que proceden de una materia que estuvo viva, es decir, de origen animal o vegetal, se pueden extraer de plantas, hojas, maderas, etc., u órganos o material de animales como la vejiga, la sangre, etc. Sus características técnicas pueden resumirse así:

Acostumbran a ser bastante transparentes pero con gran poder de coloración.

Hay tipos que poseen una buena solidez a la luz, como el *negro marfil* (obtenido de la calcinación del marfil), aunque la mayoría de los pigmentos orgánicos de origen animal suelen ser poco estables a la luz. Son generalmente insolubles en agua y cuesta diluirlos en ella.

Micronización.

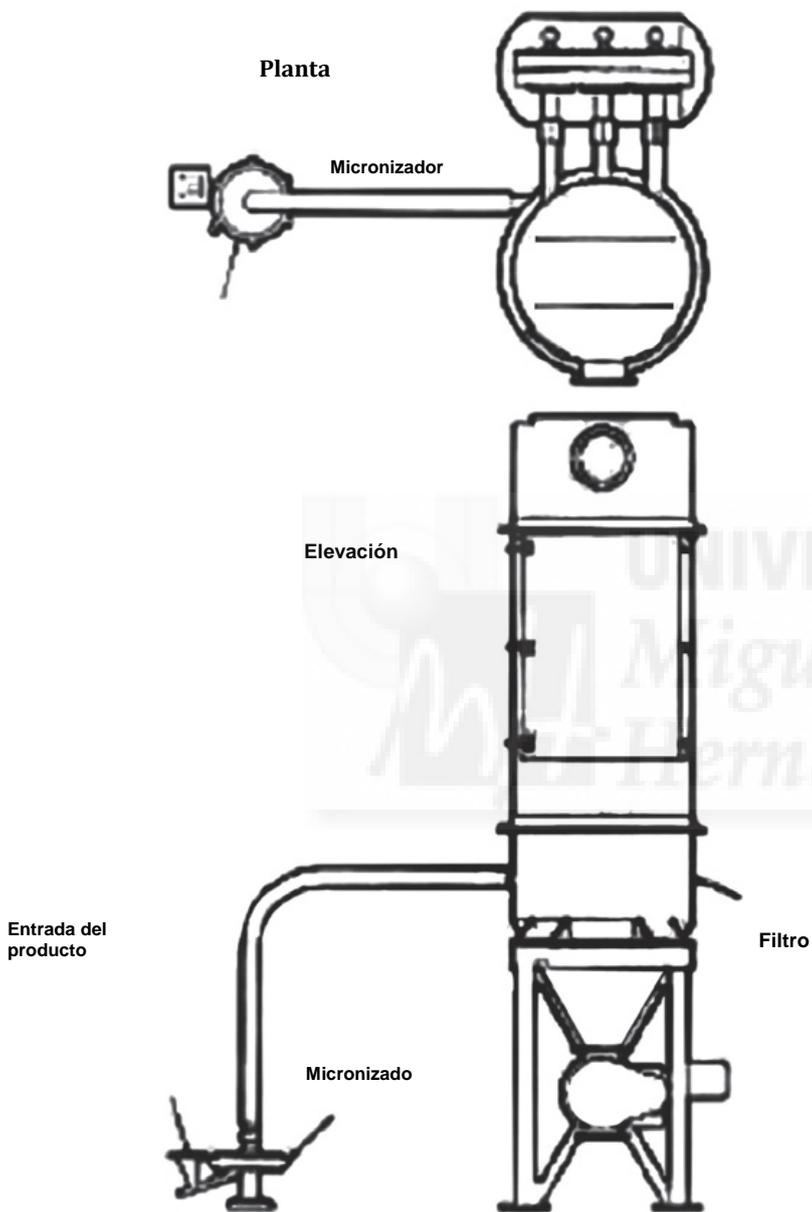
La micronización es un proceso de molido ultrafino de productos por medio de molinos con aire comprimido (air jet mills). El molido se lleva a cabo debido al choque entre las partículas del propio producto que, recibiendo la energía del aire comprimido, gana velocidad de hasta 500 m/s. Con el choque, las partículas disminuyen de tamaño hasta llegar a la calidad deseada

Este proceso permite excelentes ganancias en calidad de producto, inclusive permite la utilización de materias primas nacionales, que muchas veces tienen granulometría impropia para la utilización, tornándolas aceptables en el que se refiere a la calidad. Algunos productos, cuando tienen granulometrías más bajas (mallas 500, 600, 800, 1000, 1500, entre otras) adquieren propiedades antes no percibidas, pudiendo ser utilizadas en nuevas opciones de mercado.

Otro punto positivo del proceso de molido ultrafina con micronizador es la no contaminación, ya que no existen otros tipos de materiales en contacto con el producto, como metales que están presentes en molinos de martillos, cuchillos, bolas, entre otros objetos (57)



Figura 4- ESQUEMA GENERAL DEL MICRONIZADOR



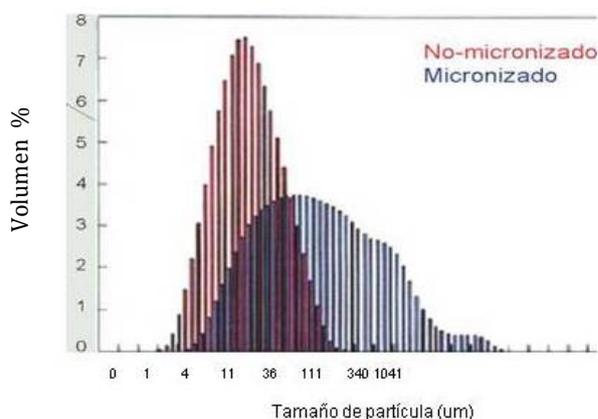


Figura .5. Análisis comparativo de la distribución de partículas entre un pigmento micronizado y otro no- micronizado. Novacoski R, www.cosmeticonline.la Vol 1 julio-agosto 2010.

1-8 – Cicatrización y reparación de daños a la córnea.

La córnea transparente es el elemento dióptrico (refráctil) primario del globo ocular y está cubierta por un epitelio estratificado plano no queratinizado. El estroma corneal consiste en laminillas alternadas de fibrillas colágenas y fibroblastos (queratocitos). Las fibras colágenas tienen un diámetro y un espaciado muy uniformes; las fibras de laminillas contiguas están orientadas entre sí de manera más o menos perpendicular. Esta disposición ortogonal de fibrillas muy regulares es la causa de la transparencia de la córnea. La superficie posterior está tapizada por una capa simple de células epiteliales cúbicas bajas que a veces recibe el nombre de endotelio corneano. Este epitelio se apoya sobre una lámina basal gruesa conocida como membrana de Descemet.

Casi todos los intercambios metabólicos de la córnea avascular ocurren a través de este epitelio.

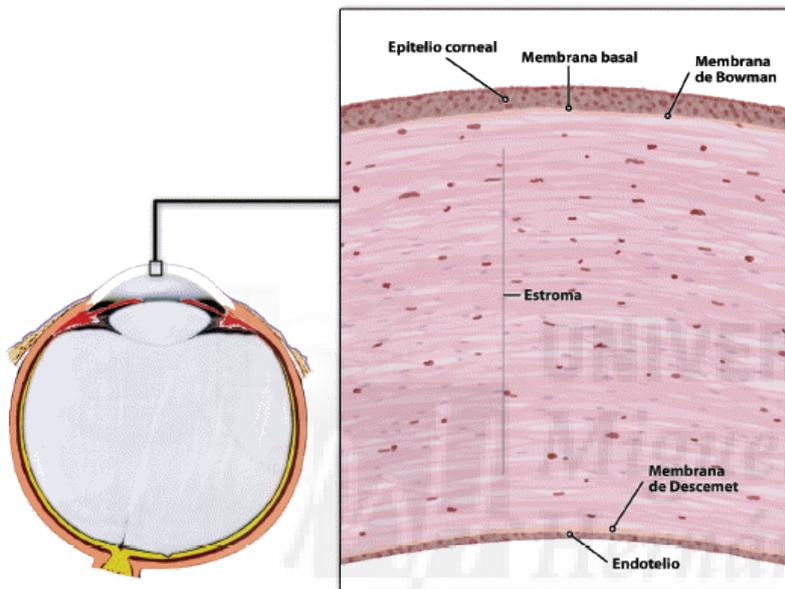


Figura-6 Imagen histológica de córnea normal (200x): epitelio corneal estratificado y membrana de Bowman (A), estroma (B), membrana de Descemet (C) y endotelio (D)

La reparación de daños a tejidos intraoculares con frecuencia lleva a proliferación fibrosa en el compartimento ocular afectado, metaplasia fibrosa en el epitelio del lente, y a proliferación de células gliales (gliosis) en la retina. Las más importantes investigaciones básicas en relación a la cicatrización de heridas oculares se han desarrollado en la córnea.

Cualquier forma de trauma que dañe la superficie del epitelio corneal muy pronto producirá un incremento en la tasa de migración para restablecer el epitelio de superficie. Estudios han mostrado interacciones complejas entre las células epiteliales dañadas, el stem cells limbal y el estroma subyacente.

A modo de resumen, los eventos que ocurren para la cicatrización de un daño corneal son:

- 1- La apoptosis de queratocitos en los extremos de la herida. La vía de señalización es a través de citoquinas (por ejemplo Fas- ligand e interleukina 1) desde las células del epitelio dañado hasta los queratocitos estromales.
- 2- El reemplazo de los queratocitos apoptóticos por migración y proliferación de queratocitos remanentes.
- 3- Metaplasia de queratocitos estromales hacia miofibroblastos que restauran el colágeno, glicosaminoglicanos y otros componentes de la matrix. El colágeno en la córnea normal es principalmente de tipo I y en menor cantidad de tipo III, V y VI. El reemplazo del colágeno, sin embargo, es primariamente por tipo III.
- 4- Los miofibroblastos también producen factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factores de crecimiento de queratinocitos (KGFs) y otras citoquinas. El HGF promueve la hiperplasia epitelial.
- 5- El crosslinking de colágeno restituye la fortaleza mecánica de la córnea pero solo rara vez la transparencia completa es restaurada. La membrana de Bowman del estroma corneal es formada durante la embriogénesis, por lo que cualquier disrupción o pérdida es una indicación de previo daño corneal, incluyendo cirugías como la queratectomía fotorefractaria o queratoplastia penetrante.

La matrix de metaloproteinasas, un grupo de enzimas degradativas (colagenasas, gelatinasas, stromelysin, etc) que juegan un papel muy importante en la respuesta curativa de la envoltura corneo-escleral sufre cambios de importancia ante eventos traumáticos, el pterigium, queratocono o en ciertas enfermedades sistémicas como la artritis reumatoide.

El endotelio corneal humano tiene una limitada capacidad para dividirse. Durante la vida existe una disminución gradual en la población total de células endoteliales que es compensada por ensanchamiento de las células endoteliales adyacentes.

Las células endoteliales son muy delicadas y cualquier trauma incluyendo la cirugía intraocular es capaz de destruir áreas substanciales de esta monocapa, cuales son compensadas por estiramiento de las células vecinas. Como estas células tienen una limitada capacidad de cubierta, una vez su número haya disminuido, la descompensación corneal sobreviene por hiperhidratación del estroma con opacificación como resultado.

Aquellos daños penetrantes en la córnea donde la lesión no conlleva penetración de todo el espesor corneal, pueden producir complicaciones secundarias que hay que tener en cuenta al momento de evaluar las muestras biológicas, por ejemplo invaginaciones del epitelio. El fallo en el cierre de la herida corneal permite la migración hacia el espacio estromal. Cuando el epitelio crece en una herida penetrante, las células que migran a través del ángulo de la cámara y como resultado aparece un glaucoma de ángulo abierto.

Las células de la envoltura esclero-corneal reaccionan ante cualquier evento traumático o lacerativo proliferando, y como consecuencia forman una densa reacción cicatrizal, que puede en casos graves producir desorganización del contenido intraocular.

Las reacciones a cuerpo extraño intraoculares, por definición, pueden solo ocurrir seguido a una lesión penetrante en el globo ocular, aunque por lo general el cuerpo extraño no puede ser localizado en la línea de trayectoria debido al rebote. Los cuerpos extraños más comúnmente encontrados son la madera, hierro, cristales, plásticos y plomo. Una complicación importante tras la entrada del cuerpo extraño es la inoculación de hongos y bacterias que pueden llegar a desencadenar una endoftalmitis intratable. La ausencia de una infección piogénica secundaria, el cuerpo extraño puede ser rodeada por una densa reacción inflamatoria granulomatosa.



Figura-7. Herida penetrante de la córnea. Invaginación y crecimiento del epitelio corneal hacia el estroma.

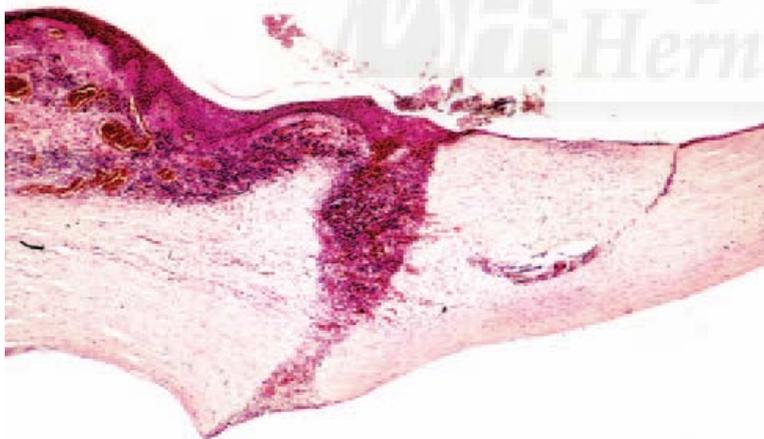


Figura-8. Microfotografía de una herida penetrante de la córnea por un cristal. Hay pérdida del epitelio de superficie, detritus celulares y desarrollo de inflamación con formación de pannus. HE

En las últimas décadas, el uso de biomateriales en el campo de la oftalmología ha ido creciendo, su uso para el tratamiento de varias patologías específicas es ya de uso generalizado. Sin embargo, los biomateriales deben cumplir ciertos requisitos para ser usados en el humano:

- 1- Ser biocompatibles, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial
- 2- No ser tóxico, ni carcinógeno
- 3- Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) o inerte
- 4- Tener una resistencia mecánica adecuada
- 5- Tener un tiempo de fatiga adecuado
- 6- Tener densidad y peso adecuados
- 7- Tener un diseño de ingeniería adecuado
- 8- Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala

La córnea normal es transparente y se mantiene por sí sola como un sitio inmune privilegiado gracias a ser avascular. Cualquier insulto ocular, incluyendo la queratitis infecciosa, condiciones inmunológicas, trauma corneal, daño por álcali, y al uso de lentes de contacto pueden provocar que nuevos vasos sanguíneos crezcan desde el limbo, fenómeno conocido como neovascularización.

La neovascularización generalmente se acompaña de respuesta inflamatoria y casi siempre representa un estado de la enfermedad.

Una definición más completa de neovascularización es, el excesivo crecimiento de vasos sanguíneos desde el plexo vascular limbal hacia la córnea, causado por privación de oxígeno o procesos inflamatorios. El trauma epitelial y/o hipoxia puede estimular la producción de factores angiogénicos por las células epiteliales locales, los queratocitos y por leucocitos infiltrantes. Algunos de estos factores (Ej. Factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico, interleukina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) han sido aislados e identificados en lagrimas y córneas (51,52). Los factores angiogénicos estimulan la degradación enzimática localizada de la membrana basal de los vasos perilimbales en el ápex del asa vascular, entonces las células endoteliales migran y proliferan a formar nuevos vasos sanguíneos.

1-9- Biocompatibilidad.

Dada la definición de biomaterial (material diseñado para interactuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo), el estudio de biocompatibilidad se entiende como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico relativo a los materiales estudiados

Biocompatibilidad es considerada como la cualidad de un material de ser compatible con el entorno biológico, es decir, la capacidad del material para interactuar con los tejidos vivos, sin causar daño o muy pocas reacciones biológicas. La reacción del organismo a un biomaterial no depende sólo del tipo de material sino también del tamaño de las partículas generadas, del área y de su morfología.



2- JUSTIFICACIÓN

Las técnicas de queratopigmentación son técnicas de uso antiguo, cuyo empleo en la cirugía oftalmológica moderna ha sido muy reducido. Para su realización se han empleado pigmentos de distinta índole, no existiendo en general ningún estudio sistemático que permita conocer su persistencia a lo largo del tiempo, las complicaciones asociadas a su uso y en particular, si son toleradas por la córnea normal, transparente sin asociarse a fenómenos inflamatorios o de tipo cicatrizal.

Sin embargo, las técnicas de pigmentación debidamente manejadas, hoy día pueden ofrecer una alternativa real a ojos con deformidades cosméticas importantes, cuya única alternativa es la cirugía reconstructiva del globo ocular o la misma enucleación o evisceración con implante de prótesis. Estos procedimientos, además de ser poco deseables, no siempre se asocian a resultados definitivos y son irreversibles.

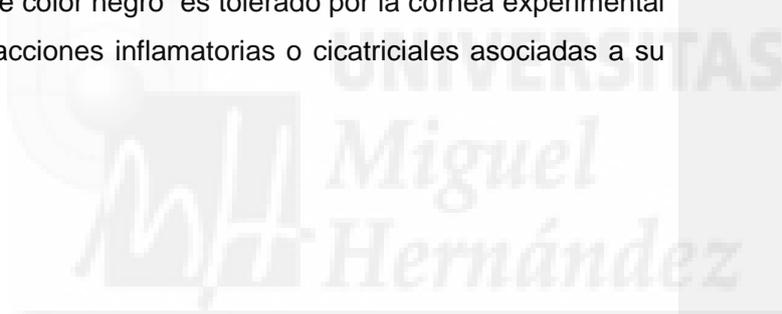
La presente tesis doctoral, pretende objetivar la utilidad de una nueva serie de pigmentos micronizados minerales para su empleo en las técnicas de queratopigmentación corneales, esclarecer su eficacia, su permanencia y estabilidad, así como evaluar si estos pigmentos intraestromales desarrollan reacciones inflamatorias, neovascularización o cicatrices y así mismo, crear un modelo experimental para el estudio de los distintos tipos de pigmentos corneales, actualmente desarrollados para su empleo en el humano.



HIPOTESIS

3 - HIPÓTESIS

1. Los pigmentos micronizados minerales permiten la reconstrucción cosmética del globo ocular severamente deformado por traumatismos graves y enfermedades oculares crónicas, evitando con ello la cirugía reconstructiva mutilante del globo ocular.
2. Dichos pigmentos permanecen estables en el tiempo y no se asocian a reacción inflamatoria clínica, ni angiogénesis.
3. El pigmento de color negro es tolerado por la córnea experimental sin inducir reacciones inflamatorias o cicatriciales asociadas a su uso.



OBJETIVOS



4 - OBJETIVOS DE TRABAJO

1. Evaluar la eficacia clínica que, como técnica cosmética, tienen las técnicas de Queratopigmentación basadas en el uso de pigmentos micronizados minerales. Establecer las técnicas quirúrgicas para su uso, así como su combinación para obtener los mejores resultados cosméticos posibles.

2. Estudiar la biocompatibilidad y tolerancia a estos pigmentos desde la perspectiva clínica y anatomopatológica.

3. Estudiar en un modelo experimental adecuado (conejos albinos y cerdos) la tolerancia y comportamiento anatomopatológico del pigmento micronizado negro, al ser éste el más comúnmente utilizado para la queratopigmentación simuladora de la pupila. Analizar los posibles cambios histopatológicos como reacción inflamatoria, angiogénesis, cicatrices o cualquier otro que se desarrolle en la córnea, especialmente en el estroma secundario al uso de los pigmentos micronizados.

MATERIAL Y METODOS



5 - MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluyó dos formas de QTP dependiendo de cómo se percibía. Tinción corneal intraestromal (TCI) y, Tinción corneal superficial (TCS).

5-1 Experiencia ex –vivo

Antes de realizar el estudio experimental de QTP en conejos para evaluar determinados aspectos histológicos y biocompatibilidad de los pigmentos, realizamos un estudio con 30 ojos de cadáveres de cerdos para practicar la cirugía, estandarizar la profundidad a la que deberíamos aplicar la tinta, el tipo de aguja más adecuada, y regularizar todo el procedimiento. En este estudio ex vivo se usó el pigmento negro, marrón, azul y verde. Este estudio fue aprobado por la Comisión de Ética en la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández de Alicante en el 2009.

El primer paso antes de practicar la cirugía es medir el espesor local de la córnea en diferentes áreas por medio del sistema OCT (Carl Zeiss Meditec AG) a fin de decidir la profundidad lamelar adecuada de túnel de femtosegundo. Posteriormente, se miden los diámetros blanco-blanco, horizontal y vertical, con un calliper para determinar el diámetro de la disección lamelar.

Con estos instrumentos se aplicaron los diferentes colores de pigmentos micronizados en ojos de cadáver de cerdo para depurar la técnica y ver el color resultante luego de la aplicación.

Para comprobar la profundidad que alcanzaba la micropunción en el estroma corneal se hicieron pruebas con casi todos los tipos de agujas disponibles en ojos de cadáver de cerdo y luego se procesaron por anatomía patológica para valorar la profundidad alcanzada por el pigmento con cada una de ellas (Tinción con Hematoxilina-Eosina).

La profundidad “máxima” se refiere a la máxima distancia que la aguja sobresale del cartucho plástico, mientras que la “mínima” hace referencia a la mínima distancia que sobresale dicha aguja y consigue pigmentar el tejido corneal.

Tras la pigmentación empleando esta técnica los ojos se fijaron en formol 10% y fueron procesados para realizar anatomía patológica. Los cortes de las córneas fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y analizados para valorar a qué profundidad del estroma corneal se encontraba el pigmento. La profundidad media del pigmento fue de 106 μm .

Para comprobar la profundidad que alcanzaba la micropunción en el estroma corneal se hicieron pruebas con casi todos los tipos de agujas disponibles en ojos de cadáver de cerdo y luego se procesaron por anatomía patológica para valorar la profundidad alcanzada por el pigmento con cada una de ellas (Tinción con Hematoxilina-Eosina).

La profundidad “máxima” se refiere a la máxima distancia que la aguja sobresale del cartucho plástico, mientras que la “mínima” hace referencia a la mínima distancia que sobresale dicha aguja y consigue pigmentar el tejido corneal.

En este estudio se probaron 4 colores: Negro 456, Marrón 492, Verde 494, y Azul 493:

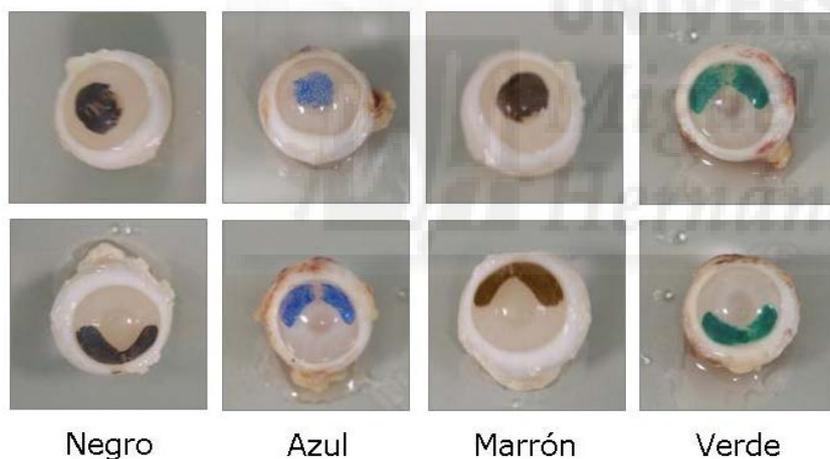


Figura:- 9. Ojos de cerdos (Enucleación) Aspecto macroscópico con QTP central y periférica donde se utilizaron diferentes colores.

El análisis histopatológico de las córneas estudiadas en aquel momento no mostró ningún tipo de inflamación con el pigmento negro,

moderada neovascularización con el marrón, ninguno o leve con el verde y leve con el pigmento azul.

En este trabajo de tesis decidimos usar el pigmento micronizado negro 457 (Biotek Italia) por ser el que mejores resultados demostró en el estudio con ojos de cadáveres de cerdos y probablemente el mas demandado en la clínica en un futuro por las características étnicas de nuestra población.



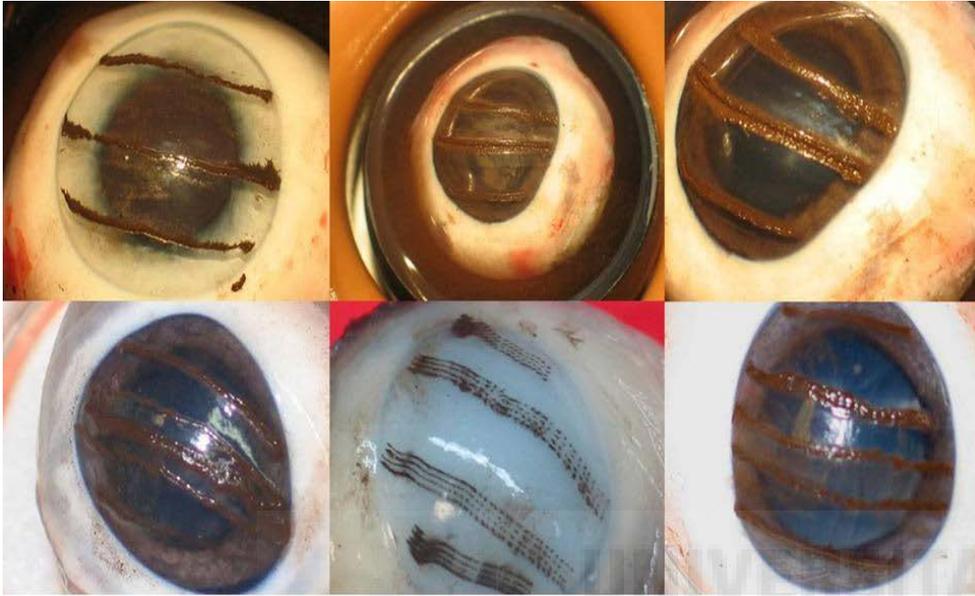
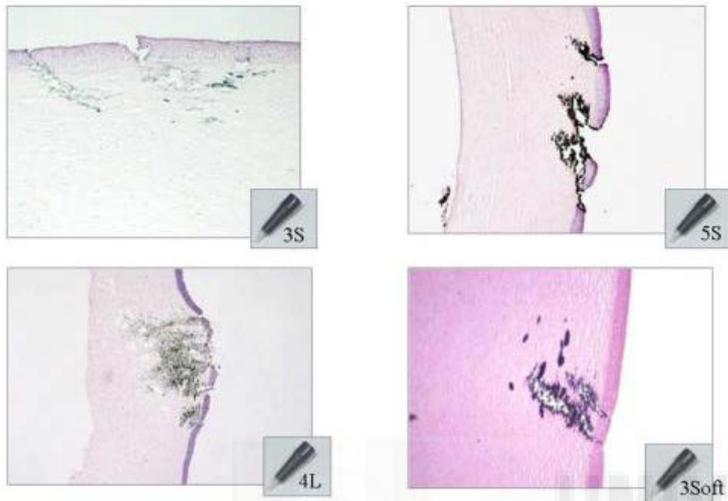


Figura: - 10. Prueba de profundidad de las agujas en ojos de cadáver de cerdo

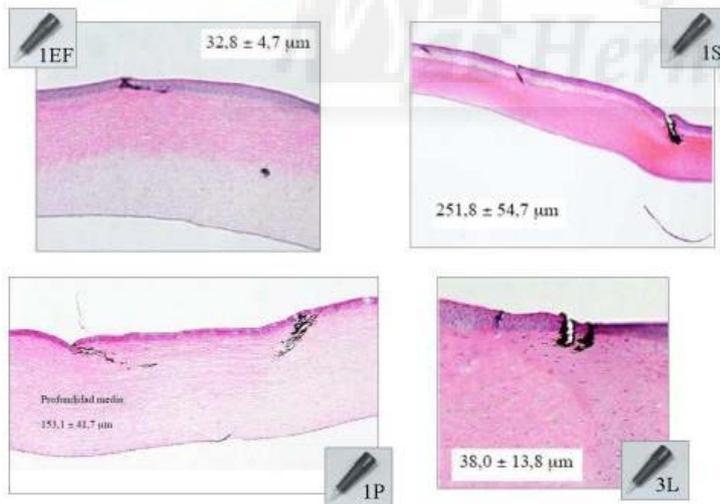
Profundidad máxima



Profundidad máxima



Profundidad mínima



Profundidad mínima

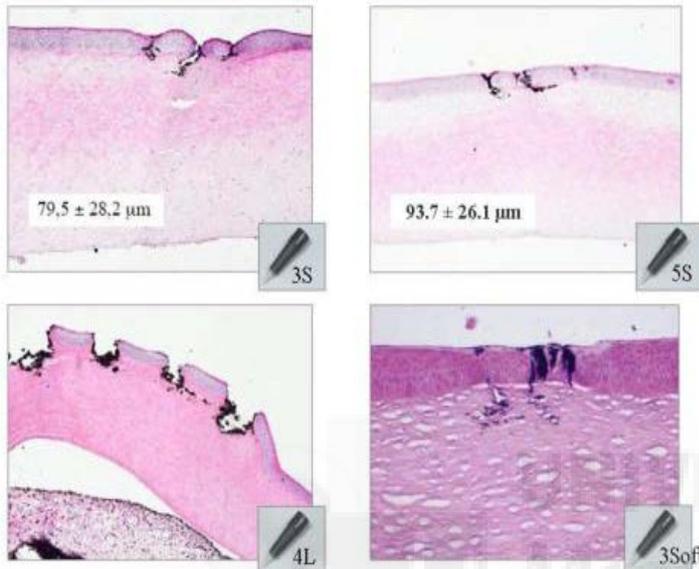


Figura:-11. Cortes histológicos (H/E) a distintas profundidades con las diferentes agujas

Los datos de las profundidades obtenidas con los diferentes tipos de agujas al máximo y mínimo se aprecian en el siguiente gráfico:

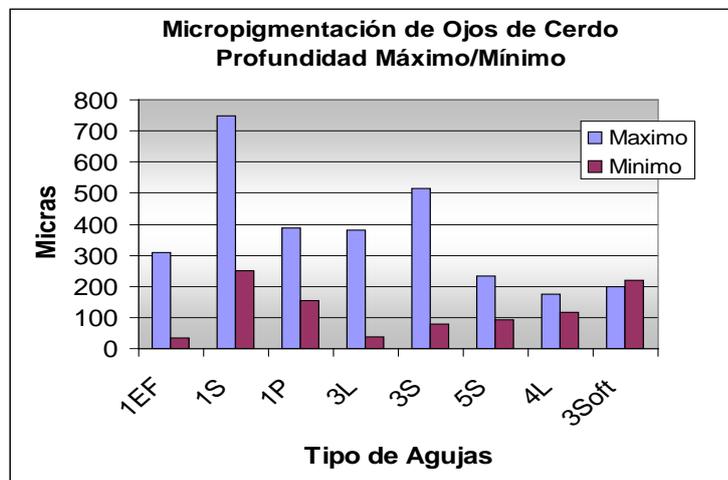


Figura:- 12. Análisis profundidad / tipo de aguja empleada en QTP

Con este estudio se concluye que la profundidad a la que se debe trabajar para tener un margen de seguridad adecuado es la “mínima”, dado que con cualquiera de las agujas utilizadas la profundidad máxima alcanzada no supera las 250 micras.

Teniendo en cuenta que la córnea humana tiene entre 500 y 550 micras de espesor, estos valores serían perfectamente seguros para pigmentar la córnea sin perforarla. Al ubicarse el pigmento por debajo del epitelio de la córnea favorecería además la permanencia del mismo en el estroma corneal, ya que pigmentaciones superficiales del epitelio serían transitorias debido a la frecuente renovación celular de esta capa de células.

Utilizando los datos de profundidad más adecuados y las agujas seleccionadas se pigmentaron ojos de cadáver de cerdo para intentar reproducir los colores del iris humano.

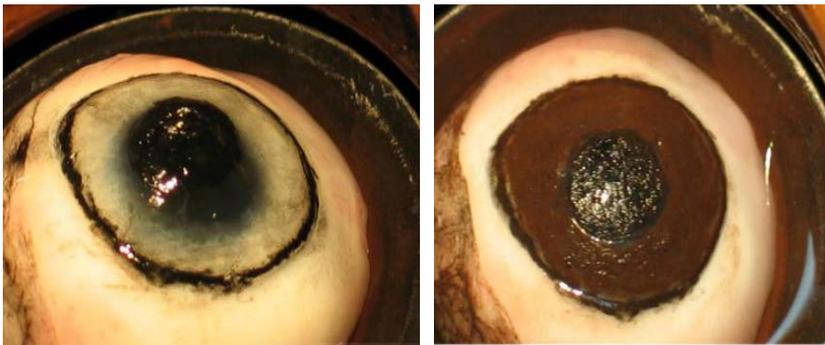
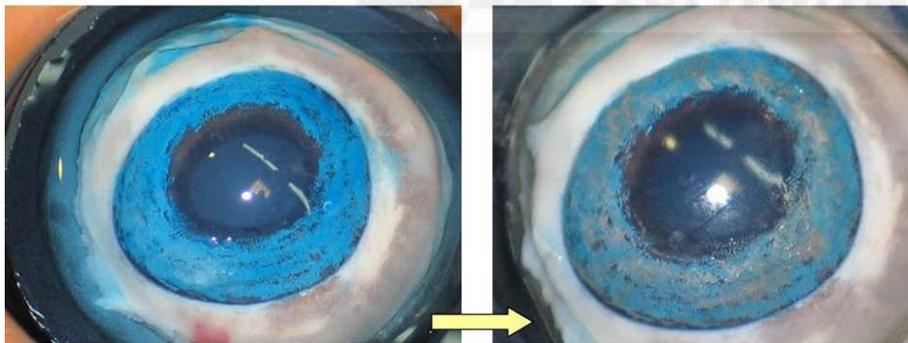


Figura.13- *Pupila + Limbo corneal (negro)*

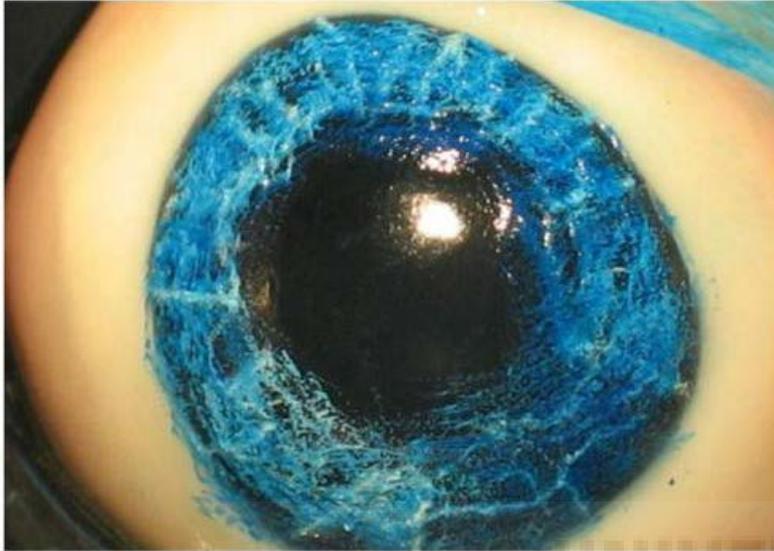
Pupila + Limbo corneal (negro) + Iris (marrón)

Hemos recurrido además, a la mezcla de colores para obtener un acabado final del iris más natural o fisiológico:



Azul cobalto + Gris claro

Azul cobalto + Gris claro + Gris oscuro 444

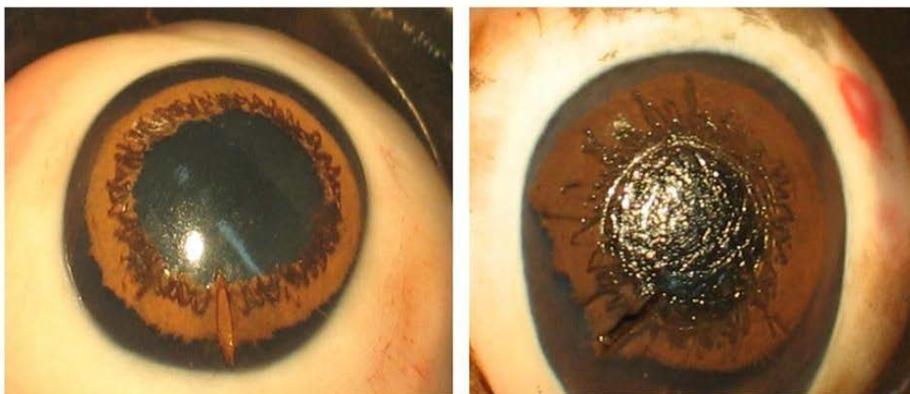


Fondo Iris: Azul cobalto (NCH 11) con 5S.

Detalles: blanco (EP 428) con 1S.

Pupila: sin tocar

También hemos combinado la técnica Intraestromal Manual con la Superficial para lograr efectos más naturales en los ojos de cerdo pigmentados.



Iris: Intraestromal manual con Blond 5 (441)
Detalles: Marrón 492 con 1S.
Pupila: sin tocar.

Iris: Intraestromal manual con Marrón 492.
Detalles: Marrón oscuro Brun4 (454) con 1S.
Pupila: Black liner 456 con 1P

5-2 Estudio experimental en un modelo animal con QTP

5-2-1 Material

Este proyecto llamado “Ensayos de biocompatibilidad y tolerancia de pigmentos minerales micronizados para queratopigmentación en conejos” comenzó en el año 2009 y fue aprobado por la Comisión de Ética de Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández de Alicante.

Se utilizaron 60 ojos de 30 conejos albinos de 5kg de peso en promedio (4.760grs - 5.045grs) en perfecto estado de salud y bajo supervisión médica e higiénico-sanitaria por personal calificado del animalario de la Universidad Miguel Hernández y también por nuestro equipo. A todos, en total asepsia, uso de anestesia y en quirófano se les realizó la QTP.



Fig-17 Conejo de raza albina (Oryctolagus Cuniculus)



Figura-18. Dr. S. Rey realizando el procedimiento de eutanasia y extracción de globos oculares en quirófano del estabulario de la Universidad Miguel Hernández.

Dividimos los animales en tres grupos acorde al tiempo en que se le realizó la enucleación bilateral.

- **Grupo A (Seis conejos):** Se les reconoce como QTPA 1 al 6. A dos de ellos la QTP fue de tipo intraestromal manual central (ojo derecho 3 fue control) y a los otros dos de tipo periférica, dejando uno como control (el 6 ojo izquierdo). A los ocho días posteriores a la cirugía se les practicó eutanasia y extracción de ambos ojos. En este grupo evaluaríamos las alteraciones histopatológicas que podrían ocurrir durante la fase aguda de respuesta celular tras la realización del tatuaje.

- **Grupo B (Doce conejos):** Identificados como QTPB 1 al 12. A los doce se les practicó la eutanasia y extracción de ambos ojos a los tres meses después de haberseles realizado la QTP (en 11 ojos derechos con pigmentación intraestromal +1 de control y 11 ojos izquierdos la técnica usada fue la pigmentación superficial +1 de control).

- **Grupo C (Doce conejos):** Identificados como QTPC 1 al 12. A estos doce conejos restantes, la extracción ocular fue a los seis meses. Igual al grupo B, los 11 ojos derechos se les aplicó la QTP intralamelar y 1 de control y a los 11 izquierdos la periférica y uno de control.

Además, incluimos 10 ojos de cerdos (Grupo D) a los que se les había practicado la queratopigmentación intraestromal tres meses antes de haber comenzado esta tesis. A esos cinco cerdos se les había realizado la KTP en iguales condiciones técnicas y quirúrgicas que a los conejos. Por lo tanto, se sumarán a las muestras de conejo a evaluar a los tres meses posteriores a la QTP.

Todos los globos oculares destinados a examen histopatológico fueron fijados en formalina tamponada al 10% durante 48h a 72 horas. Se hizo una descripción macroscópica general y se profundizó en las características de la córnea (grosor, transparencia, aspecto y permanencia del pigmento, así como cualquier otro detalle significativo.

La córnea fue seccionada en delgados fragmentos de 2 mm de ancho máximo cada uno. Se incluyó en parafina la totalidad de la córnea y posteriormente se obtuvieron cortes con micrótopo a un espesor de 3 micras, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, Azul Alcian, Tricrómico de Masson. Se seleccionaron los cortes más representativos para tinciones inmunohistoquímicas como CD31 y Factor VIII para células endoteliales, CD3 como marcador de linfocitos T y CD20 para linfocitos B.

5-2-2- Métodos

QTP; se realizó en todos los casos utilizando pigmento negro micronizado mineral 457(Biotek Italia).

Se utilizó un nuevo conjunto de pigmentos micronizados minerales (Nº de Registro de la DGFPS 48-PH. Ministerios de Sanidad Español, 2001) compuesto de alcohol isopropílico 40%, agua 10%, glicerina 20%, dióxido de titanio C47-051 10-30%, óxido de hierro C33- 123 20-30%, indigold C37-038 15-30%, dianisidina-acetoacetanilida 20%, sorbitol, drielina, amidroxy pomelo. Se utilizó en todos los casos el pigmento

color negro 457 (Biotek Italia, distribuidos en España por Salvador Cordoba).

En veintisiete ojos provenientes de 15 conejos se realizó QTP utilizando únicamente la técnica de tinción corneal intraestromal manual (TCI).

Tres ojos fueron tomados como control, es decir se les practicó el procedimiento pero no se introdujo la tinta. He de mencionar que el método de TCI fue la técnica principal que se utiliza en clínica ya que por lo general está asociada con mejores resultados y con una tasa de éxito más alta, motivo por el cual preferimos utilizarla aquí para la serie de modelos de animales experimentales.

Se formó este subgrupo de modelos de animales experimentales con el objetivo de:

- Evaluar e investigar el potencial de la queratopigmentación utilizando pigmentos micronizados minerales en córneas de conejos de forma intraestromal manual.
- Examinar adecuadamente a nivel histopatológico la presencia y grado de inflamación, irritación, angiogénesis, y desarrollo de cicatriz.

En los otros veintisiete ojos se les practicó la queratopigmentación superficial. Tres ojos se utilizaron como control, es decir no se le aplicó la tinta.

5-2-3- Procedimiento quirúrgico

Técnica

En todos los conejos, se realizó QTP central en el ojo derecho como maniobra de constricción de la pupila, mientras que en el ojo izquierdo se realizó QTP intraestromal manual periférica. En este estudio, se usó un ojo de cada lado y grupo como control, es decir se operaron con la misma técnica, pero sin aplicar pigmento (sólo para realizar la técnica quirúrgica sin utilizar pigmento micronizado) a fin de determinar el nivel de inflamación debido únicamente a la técnica quirúrgica.

5-2-3-1:- Técnica de QTP intraestromal manual:

Ojo derecho: - QTP intraestromal manual central (construcción de la pupila - figuras 24 y 25):

Tras aplicar la anestesia intramuscular general al conejo con (Zoletil 50 10-30 mg/Kg= 0,6 ml) x 2 (Zoletil100 5-15 mg/Kg= 0,3 ml) x1 – y también anestesia tópica (Clorhidrato de tetracaína 1 mg/ml y clorhidrato de oxibuprocaina 4 mg/ml) (Colircusí Anestésico Doble®, Alcon Cusí, España).

El centro de la córnea se marca con un calliper y el tamaño del diámetro de la pupila se determina con un marcador de zona óptica de 3, 3.5, 4 o 4,5mm (*Pupil KTP markers set, Epsilon, Irvine CA, USA*). Se realizan 1 o 2 incisiones radiales a partir de los límites de la marca, con un cuchillito de diamante calibrado a 300 micras. La pupila marcada coincide con el diámetro pupilar mesópico del ojo contralateral, estimado con un medidor Holladay o pupilómetro de infrarrojos (Procyon, Bausch & Lomb Quirúrgica, Rochester, Nueva York). Como resultado de tales incisiones radiales, la córnea se

diseca intralamelarmente alrededor del 50% del valor de la medida de paquimetría de ultrasonidos y circularmente hasta la misma profundidad con un disector de córnea (*CPK corneal spiral dissector, Epsilon, Irvine CA, USA*). El número de incisiones y el tamaño de la disección es variable en función del tipo de defecto del iris y de su tamaño. Previamente se elige el color de pigmento mas adecuado para simular lo mejor posible el color del iris y posteriormente se inyecta con una cánula de 27G en las áreas de la córnea que se han disecado. En ningún caso se realizaron suturas.

Primeramente se diseñó el instrumental necesario para aplicar el pigmento dentro del estroma corneal:

1. Disector corneal queratopigmentación titanio (en L) Epsilon.
2. Disector curvo de pupila en disco izquierdo Epsilon.
3. Disector de pupila en disco Epsilon.
4. Tunelizador espiral titanio derecho Epsilon.
5. Tunelizador espiral titanio izquierdo Epsilon.



Con estos instrumentos se aplicaron los diferentes colores de pigmentos micronizados en ojos de cadáver de cerdo para depurar la técnica y ver el color resultante luego de la aplicación.



Figura: -20 Pigmentación intraestromal manual. Uso de varios colores

5-2-3-2:- Técnica de QTP intraestromal asistida por láser femtosegundo:

Ojo izquierdo:- Queratopigmentación periférica (figuras 24 y 26):
con una técnica de ICS:

El primer paso antes de practicar la cirugía es medir el espesor local de la córnea en diferentes áreas por medio del sistema OCT (Carl Zeiss Meditec AG) a fin de decidir la profundidad lamelar adecuada de túnel de femtosegundo. Posteriormente, se miden los diámetros blanco-blanco, horizontal y vertical, con un calliper para determinar el diámetro de la disección lamelar.

El procedimiento es semejante al que se utiliza para la creación del flap corneal previo a la ablación corneal de la cirugía refractiva convencional (ej. de miopía, astigmatismo, hipermetropía, presbicia).

Mediante un láser de femtosegundo (frecuencia de 60KHz y energía de 2 μ J, IntraLase, Irving CA, USA) se realiza un túnel circular de 9,5mm de diámetro externo y 4,5mm de diámetro interno y una incisión superior radial a 90° de 4mm. El pigmento seleccionado es inyectado a través de la incisión superior. Para poder realizar esta técnica es imprescindible que la córnea a tratar sea transparente ya que de lo contrario sería imposible que el láser focalice para practicar el corte deseado.

Para realizar la QTP con esta técnica se ajustaron los parámetros del láser para crear un túnel circular que simularía el iris y un bolsillo central que simularía la pupila en ojos de cadáver de cerdo.

Iris	{	Anillo: diámetro externo 9.5 mm
		diámetro interno 5.0 mm
		Profundidad: 500 μm
Pupila	{	Bolsillo: 5.0mm diámetro
		Side cut: 45 μm
		Profundidad: 200 μm

En el túnel circular en forma de anillo se inoculó pigmento marrón para simular el iris y en el bolsillo central se introdujo pigmento negro para simular la pupila.

La diferencia de profundidad entre el iris y la pupila es necesaria para evitar la mezcla de los pigmentos utilizados así lograr el efecto deseado.

La QTP intraestromal asistida por láser de femtosegundo permite obtener un perfilado mas preciso de los bordes del túnel que la técnica intraestromal manual, dando un aspecto mas natural a la pigmentación corneal.

- Técnica de QTP superficial automatizada:

Mediante el uso de un equipo en estado de prototipo preindustrial (*Vissum Eye MP System, Madrid, Spain. Apl. 2.949.539*) se realizan

micropunciones automáticas que atraviesan las capas superficiales del estroma corneal hasta una profundidad aproximada de 120 micrómetros de la superficie. Las micropunciones se realizan mediante una aguja que vibra longitudinalmente cuya profundidad se controla a medida. Esta operación se repite hasta que se introduce una cantidad adecuada de pigmento en la superficie corneal para alcanzar la apariencia visual adecuada.

Esta técnica estaría indicada en aquellos casos en que la pigmentación intraestromal, manual o asistida por láser, no fuera posible debido a una gran opacidad corneal o fibrosis del estroma.

Para llevar a cabo esta técnica se utiliza la máquina de micropigmentación Stylus (Biotek, Salvador Córdoba). Para la micropunción se utilizan diferentes agujas según si es necesario pigmentar una pupila, el iris, o el limbo corneal.

En este caso, la queratopigmentación no debe cubrir la pupila, para no causar ceguera en el animal. Se realizaron tres incisiones radiales en la córnea con un cuchillito estándar para incisión 45° (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU) desde el límite de la pupila hasta 1mm del limbo. A partir de las incisiones radiales, se diseccionó la córnea intralamelalmente y circularmente con un cuchillito mini crescent (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU). Por lo general bastaron 3 incisiones, y se continuó la disección hasta que el disector alcanzó la incisión más próxima en ambos lados. Finalmente, se realizó un bolsillo corneal en dos cuadrantes consecutivos que cubrieron el iris pero no la pupila. Se aplicó pigmento micronizado

mineral con una cánula de irrigación 30G, tras lo cual se aclaró el ojo con BSS. Se aplicaron antibióticos por vía tópica (Tobrex, Alcon Cusí, España), y Chibroxin (Norfloxacin— Laboratorios Théa, S.A. Barcelona).

La KTP se realizó siguiendo dos abordajes diferentes:

5-2-3-3- Tinción corneal intraestromal (ICS): (Figuras 23-30)

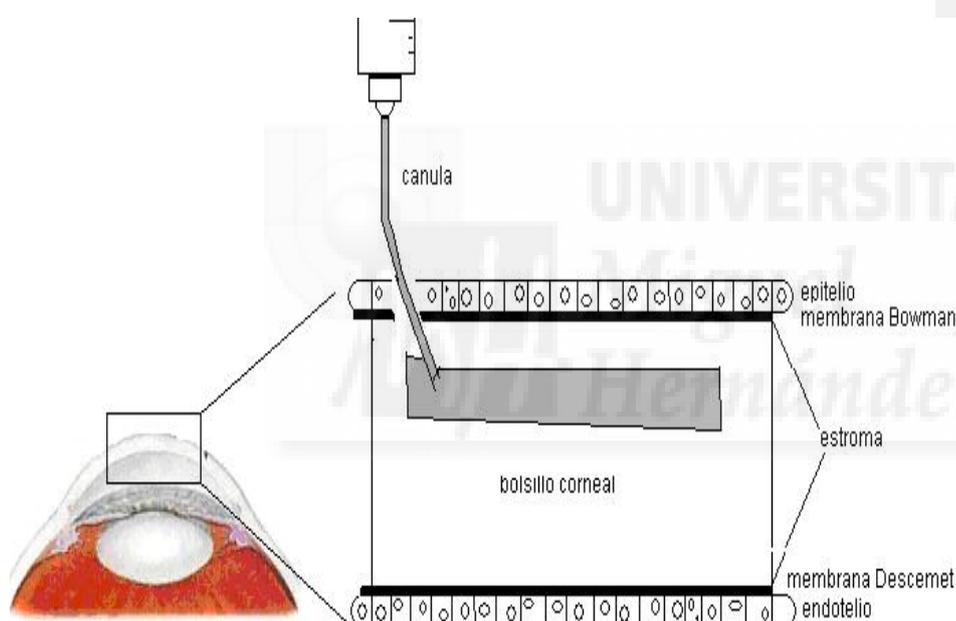


Figura.-21. Ilustración que demuestra la impregnación del pigmento mediante la técnica (TCl).

Utilizando un microscopio operatorio, se marcó el centro aproximado de la córnea con un compás y el diámetro del tamaño de la pupila se

remarcó con un marcador de zona óptica RK de 3, 3,5, 4, ó 4,5 mm (katena, New York, EEUU) (Fig.-24 A,B). Las incisiones *Freehand* (Manos Libres) con una profundidad apropiada (alcanzando el estroma medio) se realizaron con una cuchilla de diamante de forma radial desde el limbo hasta el borde de la pupila marcada. Esto se eligió para equiparar el diámetro de la pupila en bajas condiciones mesópicas del ojo sano calculado con un calibre Holladay o con un pupilómetro infrarrojo de 4 mm (Procyon, Bausch & Lomb surgical, Rochester, New York, EEUU).

Para dibujar la pupila se realizó una incisión arcuata fuera de las incisiones radiales al nivel de la circunferencia del límite de la pupila, evitando el contacto con las incisiones radiales.

A partir de esta incisión arcuata, se utilizó un mini cuchillo crescent (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU) para realizar la disección de la córnea central hasta los límites definidos de la pupila, aproximadamente el 50% del grosor total de la córnea. Posteriormente, se tiñó la pupila inyectando el agente colorante (pigmento) en el estroma corneal medio – sin extracción previa del epitelio de la córnea, la pupila negra se tiñó inyectando el color negro adecuado en el plano corneal diseccionado, utilizando una cánula de calibre 30G. Por lo general, 0,1 cc del pigmento colorante fueron suficientes para reproducir toda la pupila.

A partir de las incisiones radiales se diseccionó la córnea intralamelarmente y circularmente con un mini cuchillo crescent (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU). Por lo general se necesitaron 3 ó 4 incisiones y la disección se continuaba

hasta que el disector alcanzaba la incisión más cercana en ambos lados. Finalmente, se diseccionó toda la córnea desde la periferia hasta la pupila corneal. El color seleccionado para la córnea periférica se inyectó con una cánula de calibre 30G en el resto de la córnea periférica diseccionada.

El procedimiento finalizaba cuando se conseguía el color adecuado. Es importante recalcar que la queratopigmentación se realizó en todos los casos sin suturas.



Figura-22. Equipo Stylus 3 con puntas 5S. Potencia. 3.5-4



Figura-23. Aguja de Micropunción stylus

**5-2-3-4- Tinción corneal superficial (TCS):
(figuras 31-35)**

En estos casos, la tinción superficial se realizó creando micropunciones con una aguja calibre 30G sobre el colorante colocado encima de la superficie de la córnea. Para conseguir el color adecuado, se colocó la primera gota de colorante en la córnea y posteriormente se realizaron repetidamente micropunciones justo hasta la primera parte del estroma.

En este nivel, el bisel de la aguja calibre 30G se colocó mirando inferiormente hacia la córnea para aumentar la penetración del colorante.

La maniobra se realizó hasta que la cantidad adecuada de colorante se introdujo en la córnea superficial para conseguir un aspecto cosmético aceptable. Una vez finalizada la tinción, se aclaró minuciosamente la parte superficial de la córnea para eliminar el epitelio teñido según fuese necesario.

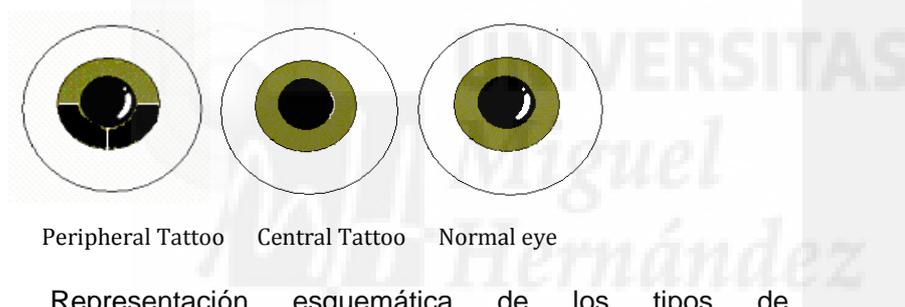


Figura-24. Representación esquemática de los tipos de queratopigmentación.

Los ojos pigmentados de los conejos presentaban el siguiente aspecto:



Figura-25. Conejos con QTP central y periférica 2 horas después de habersele realizado la QTP Derecha (tipo central, pupilar) e izquierda de tipo periférica).

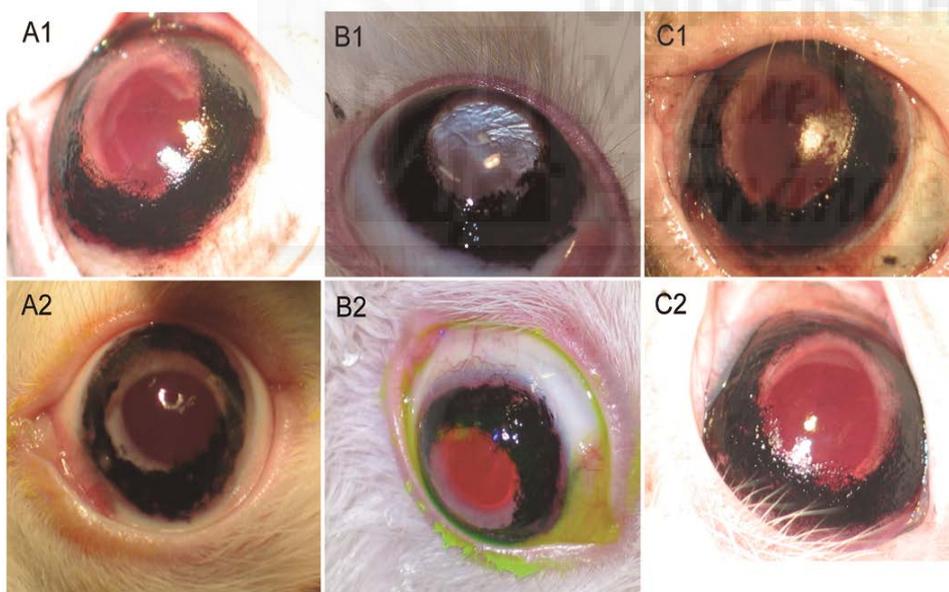


Figura-26. QTP periférica (Iris)

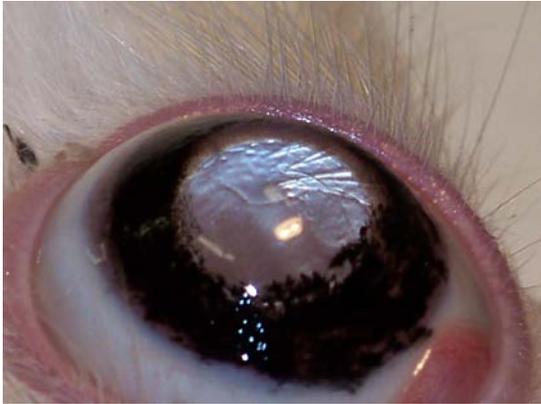


Figura-27. Vista de acercamiento de un ojo de conejo albino con queratopigmentación periférica usando pigmento micronizado de color negro.

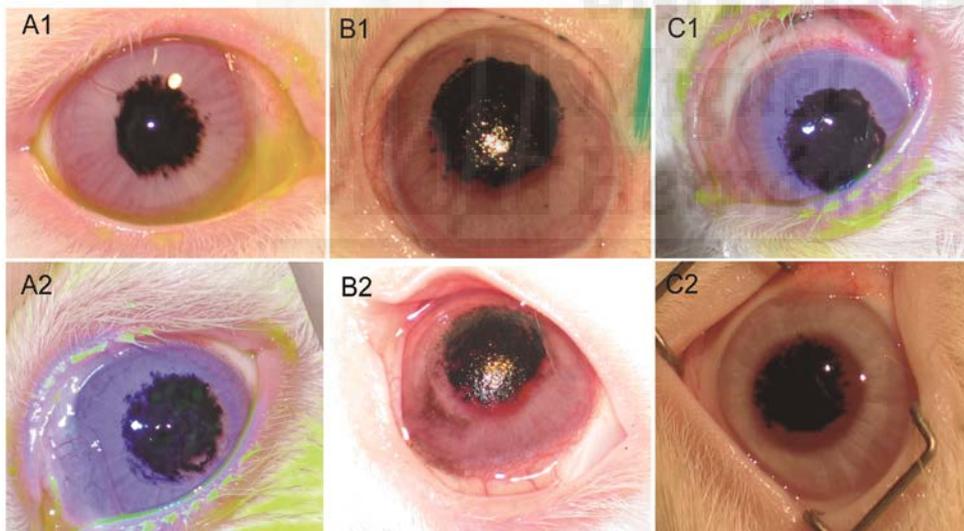


Figura-28. QTP central (pupilar) Aspecto macroscópico. Note la integridad del pigmento y los escasos signos inflamatorios oculares. Leve hiperemia.

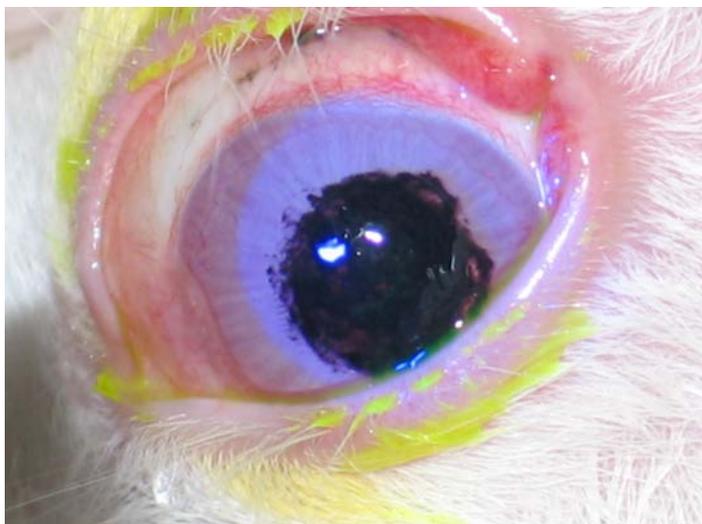


Figura-29. Vista de acercamiento de QTP central.

5-2-3-5- Variables principales y seguimiento.

Un observador independiente realizó un seguimiento de todos los animales durante el primer día después de la cirugía, al cabo de una semana, al mes, a los tres meses, seis meses después de la cirugía inicial para notificar cualquier complicación asociada.

En cada visita, la mejoría en el aspecto cosmético, la homogeneidad y permanencia del pigmento, así como el estado general de los ojos (Tabla-3 A, B) y la necesidad de otras cirugías relacionadas con el aspecto cosmético del ojo se evaluaron como variables principales siguiendo los protocolos de evaluación adecuados (Tabla- 5).

En el postoperatorio, únicamente observamos una leve inflamación e hiperemia ocular asociadas al procedimiento quirúrgico de la córnea.

El tratamiento postoperatorio que se le brindó a cada animal fue colocado por alguno de los miembros del equipo de investigación e incluyó la colocación de un colirio tópico a partir del segundo día (Maxidex, Alcon, Barcelona, España) 1 gota 4 veces al día durante una semana para aquellos que fueron sacrificados a los 8 días y por dos semanas para el resto de los animales.

En todos los casos utilizamos colirios antiinflamatorios no esteroideo (Voltaren®, Novartis, España) 2 veces al día durante una semana para reducir el malestar postoperatorio.

Desde el punto de vista práctico, la inflamación, la neovascularización y fibrosis la gradamos en cuatro grados:

- 0: No existe
- Grado 1: Leve
- Grado 2: Moderada
- Grado 3: Severa o intensa

En caso de inflamación, definir si la infiltración celular era predominantemente a expensas de polinucleares neutrófilos, linfocitos o mixta.

La inflamación grado 1 o leve, no debe haber cúmulos de células inflamatorias de más de 5 células. Usualmente, células aisladas infiltrando el estroma.

En el grado 2 o moderada, las células inflamatorias se agrupaban, formando cúmulos de 6-10 células, sin destrucción del estroma. En cambio, en el grado 3, los grupos de celulares estaban formados por más de 11 células, incluso podían formar folículos linfoides.

En caso que se advirtiese la presencia de granulomas, se reportaría independiente del grado de inflamación.

Se tuvo la precaución de anotar cualquier otro hallazgo histológico meritorio.

En cuanto al pigmento (tatuaje) se consideró:

1- Permanencia.

- Grado1: Cuando permanecía en el estroma sin dispersión y en cantidad notablemente visible.

- Grado 2: Su permanencia era visible pero era irregular, es decir sin mantener la homogeneidad en el estroma, con áreas donde predominaban grumos densos y otras mucho más tenues.

- Grado 3: El pigmento era difícil reconocerlo, predominio de pequeñas partículas sin la presencia o muy ocasionales grumos densos y no mantenía la distribución lineal en el estroma.

RESULTADOS



6- Resultados

6-1- Descripción

Al momento de la eutanasia según fecha programada para cada grupo (10 días, tres y seis meses) todas las córneas eran transparentes, aunque en los ojos extraídos a los 10 días post KTP, eran ligeramente borrosas. En el lugar en el que se inyectó el pigmento (tatuaje) no se observó edema corneal, el pigmento mostraba un buen aspecto, sin dispersión, era compacto y fácilmente delimitado. No obstante, observamos la presencia de signos de una leve inflamación conjuntival en sólo tres ojos de conejos, que fueron identificados como QTPA2, QTPB9 y QTPC7 y en los del grupo D (cerdos) el ojo 4 que tenía inflamación limbal.

Estos signos inflamatorios consistieron en irritación e inflamación conjuntival leves en el limbo próximo al pigmento. El pigmento está ubicado a 1mm del limbo en un bolsillo del sector periférico (queratopigmentación manual periférica). En ningún caso observamos queratitis.

Los exámenes de seguimiento se realizaron posteriormente según correspondía y no se observaron signos de inflamación o irritación grave. Únicamente observamos signos de una leve irritación conjuntival sin infiltración; posteriormente estos signos leves desaparecieron gradualmente, lo que al final dio lugar a una córnea clara y transparente. Por otro lado, los pigmentos se mantuvieron en su sitio del tatuaje, sin dispersarse y con un aspecto cosméticamente satisfactorio, es decir, se veían bien y la pupila resultante imitaba a la pupila sana del ojo

contralateral del mismo conejo y su aspecto era cosméticamente natural. La pupila final anatómicamente perfecta con excelente aspecto cosmético que se observó desde el primer día del postoperatorio se mantuvo idéntica hasta el final del período de seguimiento, lo que puso de manifiesto la estabilización del procedimiento con resultados excelentes y estables a largo plazo. Finalmente, concluimos el procedimiento sin ninguna complicación.

He de decir que en todos los casos, incluso en aquellos en los que no se aplicó pigmento en el bolsillo intracorneal (ojos control), los resultados fueron los mismos, y que los signos inflamatorios (muy leves) o los signos de irritación, edema corneal y demás observaciones desaparecieron finalmente al mismo tiempo o, en algunos casos, en los ojos control, 1 ó 2 días antes que en los ojos de estudio, lo cual fue intrascendente desde el punto de vista del resultado final.

6-2- Resultados del examen histopatológico

El estudio histológico de cada ojo fue completo y metodológico, con descripción del estado de cada estructura corneal. En todos los casos, el epitelio corneal estaba íntegro, sin úlceras, erosiones ni edema celular remarcable. No encontramos hiperplasia ni atrofia, es decir se mantenía el espesor normal, entre 3-5 células. (Tabla-2)

La membrana de Bowman no fue examinada ya que los conejos no cuentan con esta estructura a pesar de la gran semejanza con el ojo humano.

Los queratocitos alrededor del pigmento estaban activados, es decir eran de mayor tamaño, y muchos adoptaron aspecto estrellado. El citoplasma era eosinófilo y amplio. El núcleo era discretamente más grande, pero con aumento de la cromasia, sin nucléolo visible o muy pequeño. En el citoplasma de muchos de los queratocitos corneales cercanos a donde se había inyectado el pigmento se comprobó la existencia de muy pequeños granulos finos de tinta negra.

El estroma corneal tanto en los conejos y en los cerdos tatuados como en los casos controles no presentaba fibrosis cicatrizal, las fibras de colágeno mantenían su forma ondulada, y no se encontraron adherencias exageradas entre las fibras que se tradujeran en cúmulos densos visibles con la hematoxilina-eosina. El colágeno predominante fue el tipo I demostrado por tinción inmunohistoquímica (Fig. 31) y en menor cuantía el tipo III

La matrix extracelular del estroma se mantuvo intacta, excepto en aquellos dos animales (conejo QTPC7 y cerdo QTPD4) en los que la tinción de Azul Alcian demostró una ligera disminución de matrix de glucosaminoglicanos secundarios a inflamación leve y moderada respectivamente.

En la porción media y superior del estroma corneal se evidenció en todos los ojos tatuados la presencia lineal de pigmento de color negro. La cohesividad del pigmento fue demostrada, aunque en algunas áreas, el pigmento formaba cúmulos más densos, pero sin repercutir en el aspecto cosmético final. Los bordes de la tinta negra eran bien definidos, sin cambiar de posición, es decir sin dispersión.

El pigmento micronizado utilizado en nuestro estudio no ocasionó reacciones citotóxicas relevantes, es decir no se evidenció muerte celular o apoptosis ni condensaciones patológicas del citoplasma ni del núcleo, signos de daño celular irreversible. La interacción pigmento micronizado-tejido biológico tampoco causó alteraciones rigurosas en los distintos aparatos celulares como por ejemplo la membrana celular (capaces de alterar el equilibrio hídrico y generar edema y vacuolización celular de gravedad variable) ni tampoco en las propiedades físico-químicas del entorno celular (microambiente) fácilmente detectadas en una observación microscópica habitual y con tinciones de rutina.

El uso del pigmento negro 459 micronizado (ni sus iones liberados y expuestos) al parecer no ocasionaron daños en el aparato defensivo celular ni cambios iónicos y del ph del microambiente necesarios para generar la liberación de sustancias que favorezcan la movilización de células inflamatorias (factores quimiotácticos) y de enzimas (lipasas, colagenasas, etc) que producen lisis y alteraciones vasculares específicas. Tampoco fue recogida la presencia de reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño con células gigantes, signo inequívoco de rechazo y de incapacidad de las células para deshacerse de algún agente lesivo que actúa por un periodo prolongado de tiempo.

Los nervios corneales periféricos estaban en perfecto estado lo que permite mantener la sensibilidad corneal y conseguir una recuperación más rápida. Los bolsillos también conservan las propiedades biomecánicas de la córnea periférica lo que proporciona mayor estabilidad.

La capa endotelial en todos los animales, tatuados y controles no presentó alteraciones histológicas. En la mayoría de las células, el núcleo era muy plano, casi imperceptible con las tinciones habituales.

La membrana de Decement no presentó alteraciones en ninguno de los ojos examinados.

No se encontraron diferencias histológicas entre los ojos de conejos y de cerdos.

Tabla 2 - Variación de parámetros histológicos según grupo de conejos

GRUPO	INFLAMACION Grado	ANGIOGENESIS	FIBROSIS	PIGMENTO Grado
GRUPO A				
QTPA-1	0	0	0	I
QTPA-2	I aguda	0	0	I
QTPA-3	0	0	0	I
QTPA-4	0	0	0	I
QTPA-5	0	0	0	I
QTPA-6 control	0	0	0	NC
GRUPO B				
QTPB-1	0	0	0	I
QTPB-2	0	0	0	I
QTPB-3	0	0	0	II
QTPB-4	0	0	0	I
QTPB-5	0	0	0	I
QTPB-6	0	0	0	I
QTPB-7	0	0	0	I
QTPB-8	0	0	0	I
QTPB-9	I crónica	0	0	I
QTPB-10	0	0	0	I
QTPB-11	0	0	0	I
QTPB-12 control	0	0	0	NC
GRUPO C				

QTPC-1	0	0	0	I
QTPC-2	0	0	0	I
QTPC-3	0	0	0	I
QTPC-4	0	0	0	I
QTPC-5	0	0	0	I
QTPC-6	0	0	0	II
QTPC-7	I crónica	0	0	I
QTPC-8	0	0	0	I
QTPC-9	0	0	0	I
QTPC-10	0	0	0	I
QTPC-11	0	0	0	I
QTPC-12	0	0	0	NC
CERDOS (D)				
QTPD-1	0	0	0	I
QTPD-2	0	0	0	I
QTPD-3	0	0	0	I
QTPD-4	I mixta (\geq aguda)	0	0	I
QTPD-5	0	0	0	I
QTPD-6	0	0	0	I
QTPD-7	0	0	0	I
QTPD-8	0	0	0	I
QTPD-9	0	0	0	I
QTPD-10 control	0	0	0	NC



Figura-30. Vista panorámica de un corte histológico de córnea un conejo 3 meses después de haberle realizado la queratopigmentación. Tinción de Hematoxilina- Eosina. 400X. En esta microfotografía se reconoce el pigmento micronizado de color negro en el estroma corneal superficial, distribuido de manera homogénea, sin dispersión y en cantidad suficiente para mantener estéticamente una coloración adecuada.



Figura:- 31. KTPA-2. Presencia de pigmento en el estroma corneal. No se observó neovascularización. HE.

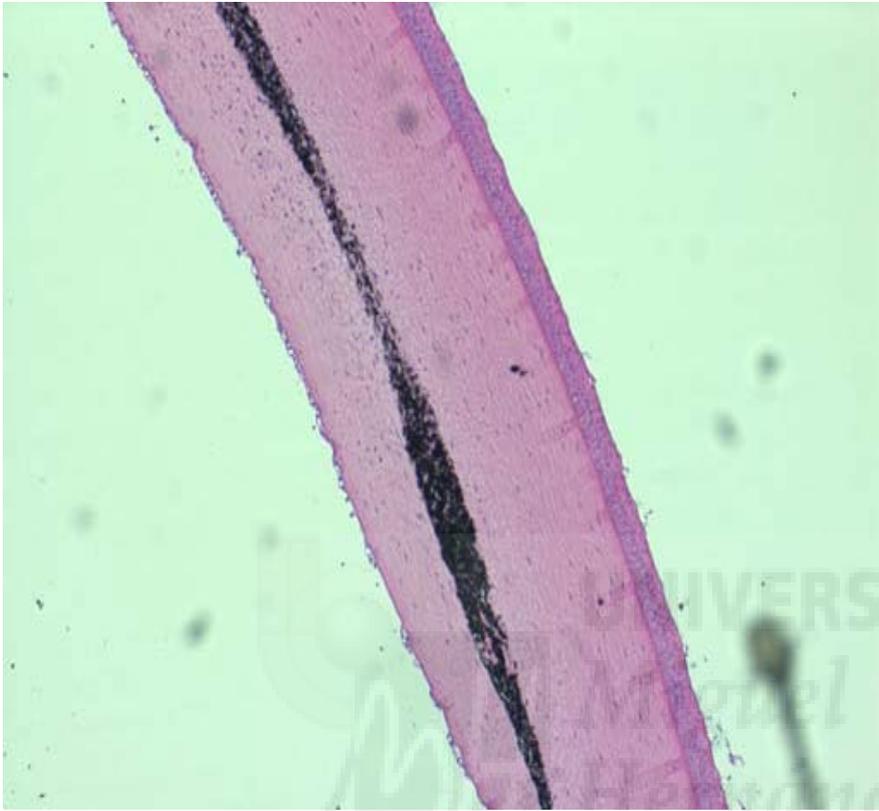


Figura:- 32. QTPB5. Presencia lineal del pigmento en el estroma corneal. La No se observa dispersión.

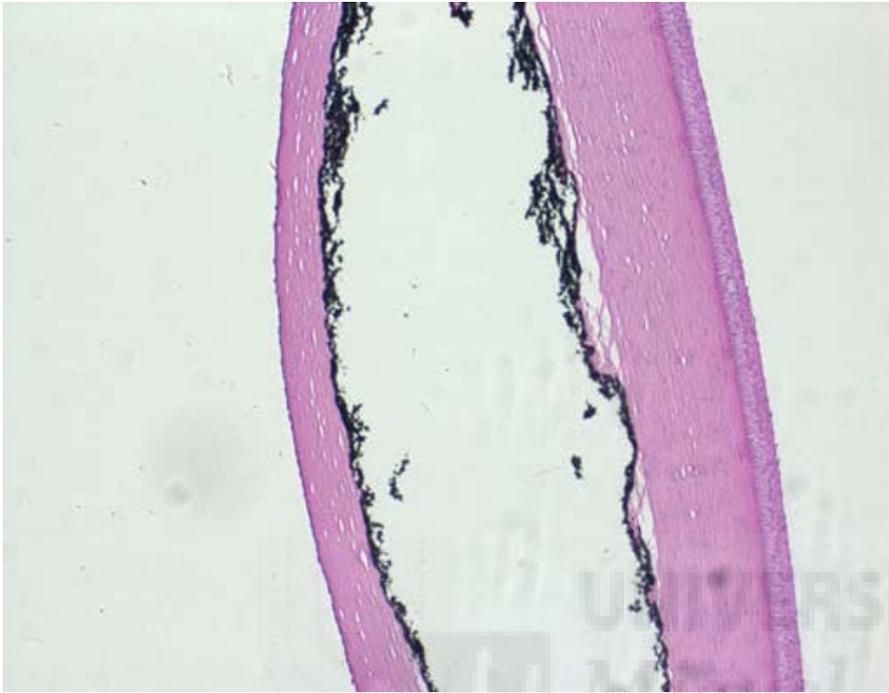


Figure:- 33. QTP intraestromal. Sección histológica de la córnea de un conejo albino a los 3 meses postqueratopigmentación. Note que el pigmento permanece en el sitio de inyección. Los bordes del pigmento son nítidas, sin dispersión. No se observan células inflamatorias ni neovascularización. HE 10X

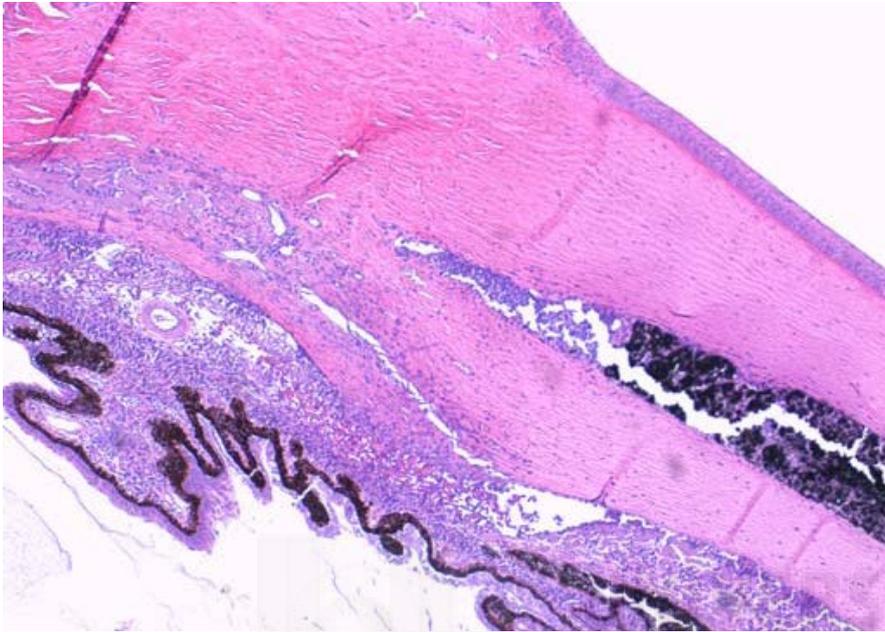


Figura:- 34. QTPB9 Presencia de inflamación crónica leve (Grado 1). El pigmento negro permanece en cantidad adecuada y estable. La inflamación estaba en el estroma más cercano al limbo. No se observó neovascularización. HE

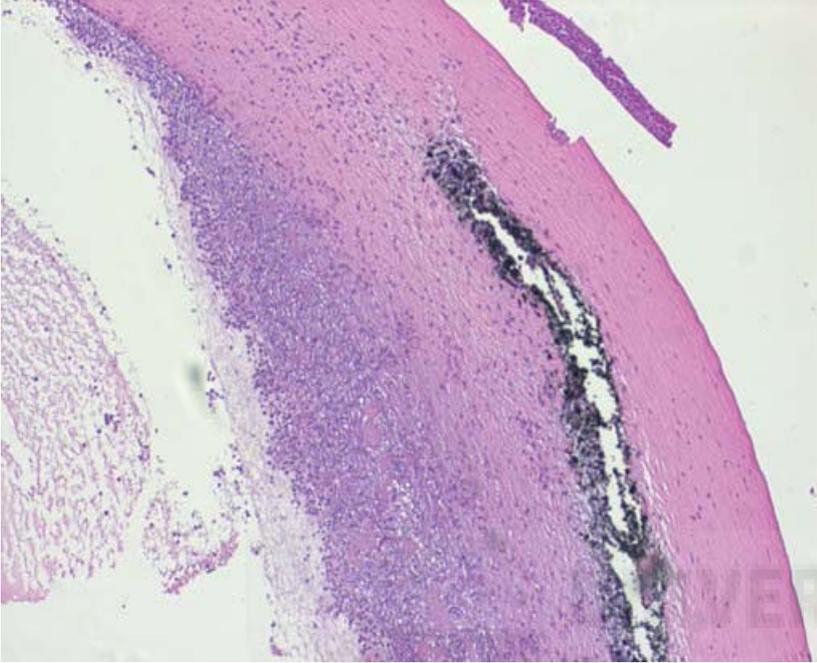


Figura:- 35. QTPD4. Corte histológico de córnea con Inflamación aguda leve focal en la cámara posterior del ojo muy cercana al limbo. No se observaron microorganismos con las tinciones usuales ni con el PAS. El pigmento permanecía en cantidad adecuada, de forma homogénea y sin dispersión. HE 10X

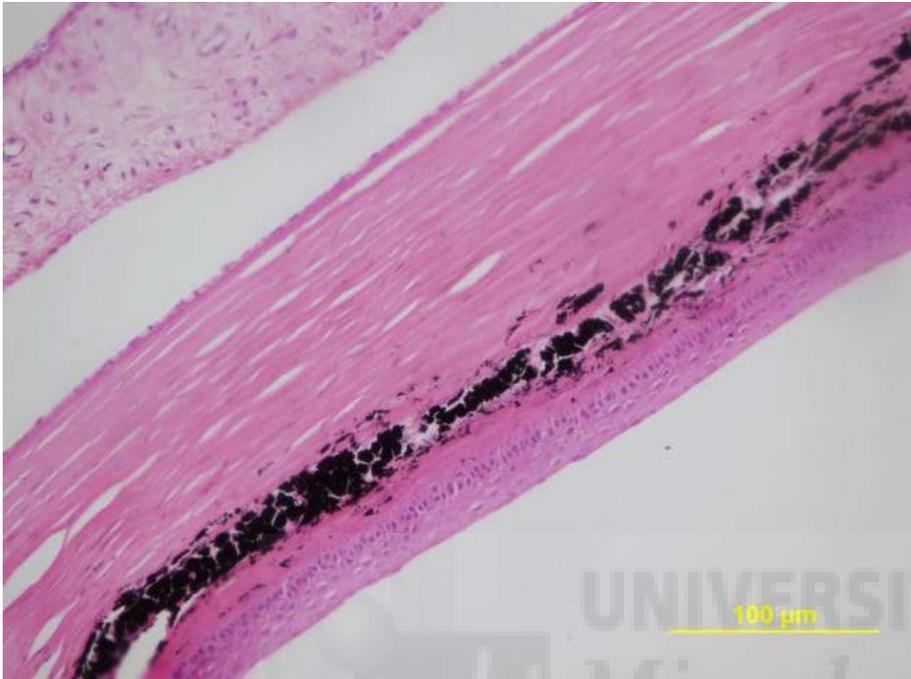


Figure:- 36. Microfotografía de acercamiento de tatuaje intraestromal. El pigmento negro permanece estable después de 6 meses del procedimiento de QTP (QTPC5). Note que no hay reacción a cuerpo extraño, neovascularización ni dispersión. HE 20X.

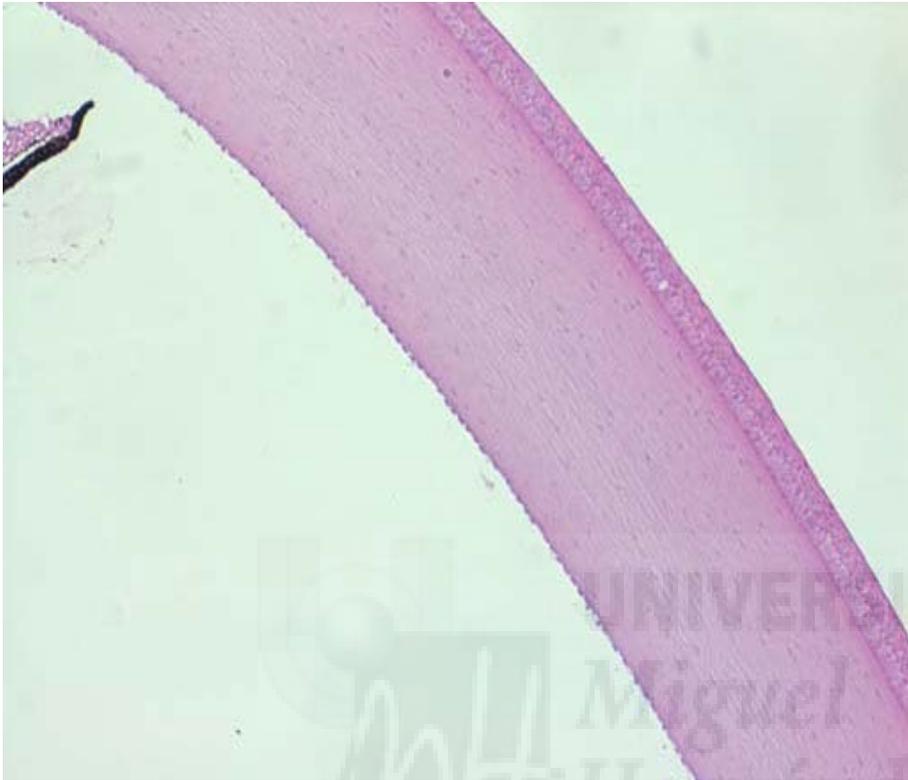


Figura:- 37. Corte histológico teñido con hematoxilina-eosina. Ojo control QTPA6 Tatuaje periférico. No se observan células inflamatorias, neovascularización no cambios estromales.



Figura:-38. Corte histológico de la córnea del ojo control. Tatuaje central. No se observa inflamación. Todas las capas corneales están indemnes.

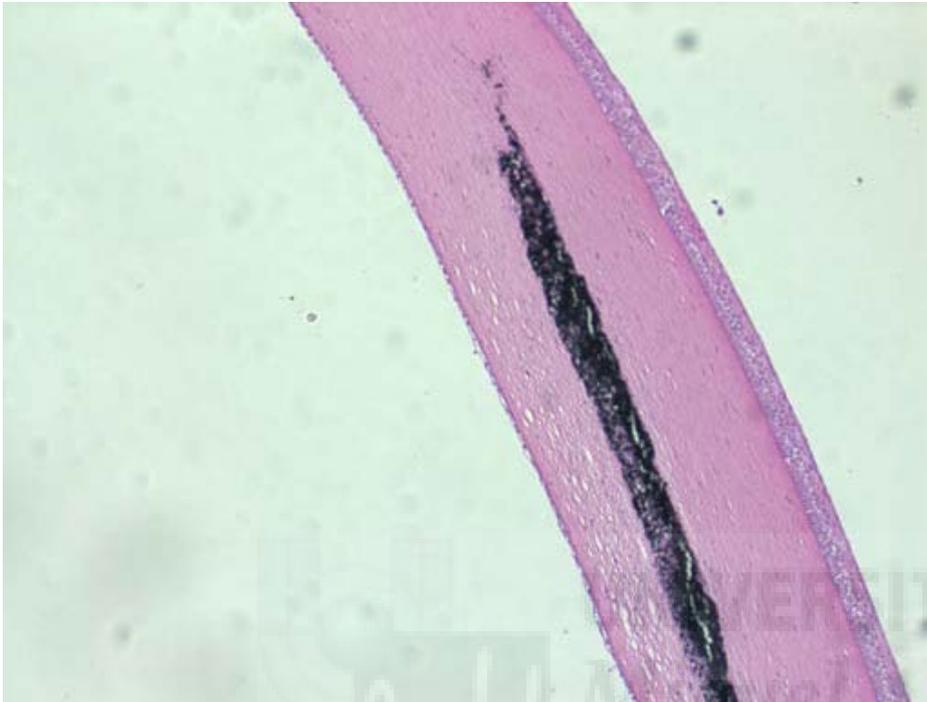


Figura:-39. QTPD8. En este corte histológico se observa en el estroma corneal el pigmento en perfectas condiciones a los 6 meses de haber realizado la QTP intraestromal (excelente permanencia). No hay inflamación ni neovascularización asociadas. HE 4X

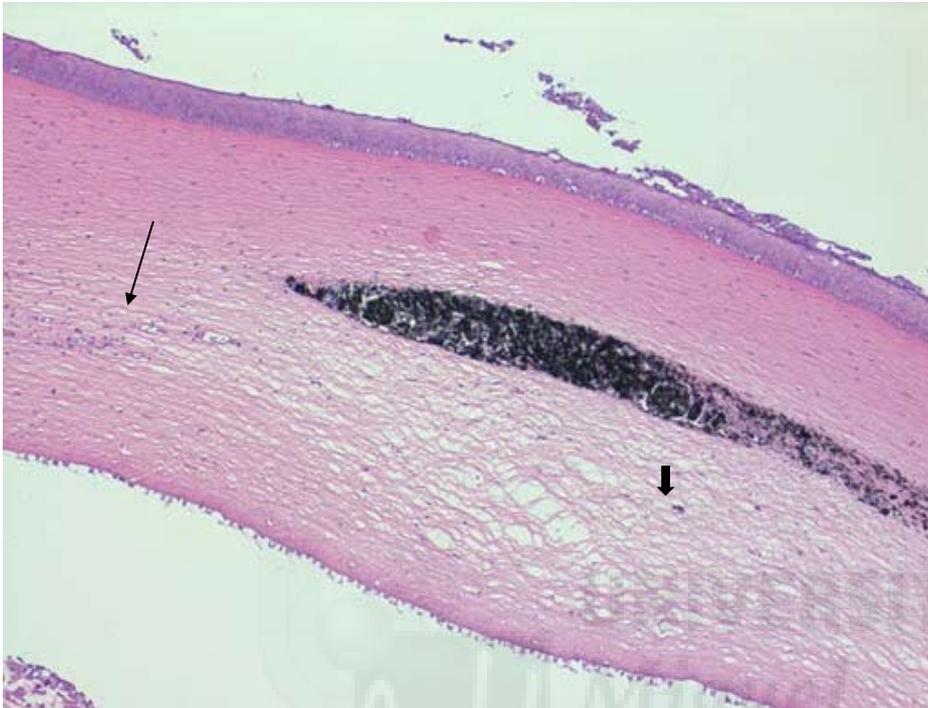


Figure-: 40. QTPC7 Presencia de leve infiltrado linfocítico en el estroma (flecha). Se observan queratocitos activados con núcleos de mayor tamaño (flecha corta) HE.

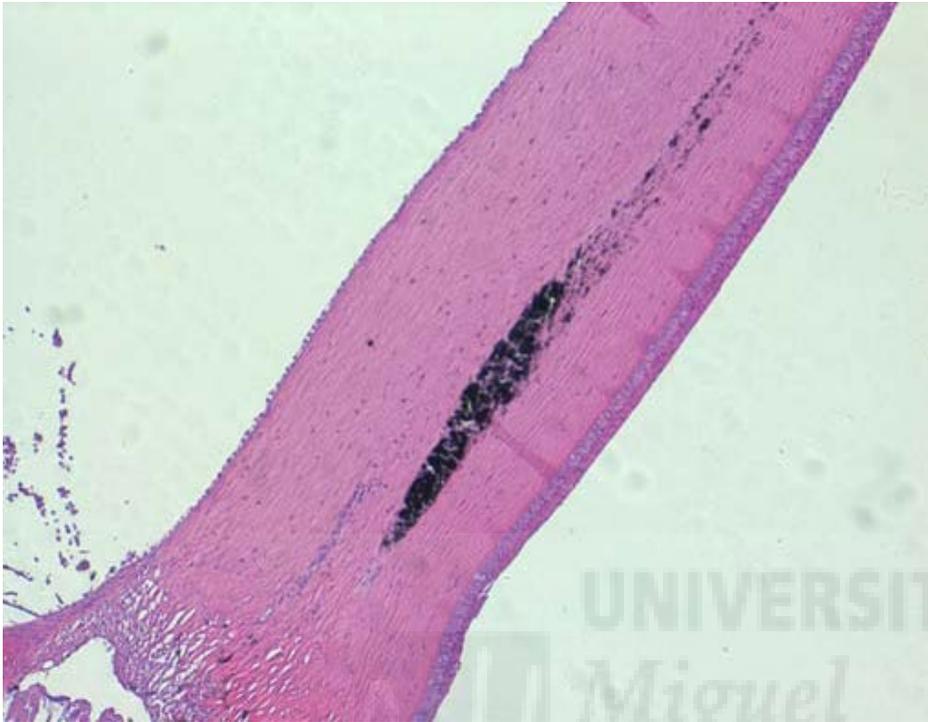


Figura:-41. QTPB3 (3 meses después de la QTP) El pigmento permanece aunque en focos predominan los cúmulos densos y en otros son más finos y menos perceptibles. No hay dispersión. HE

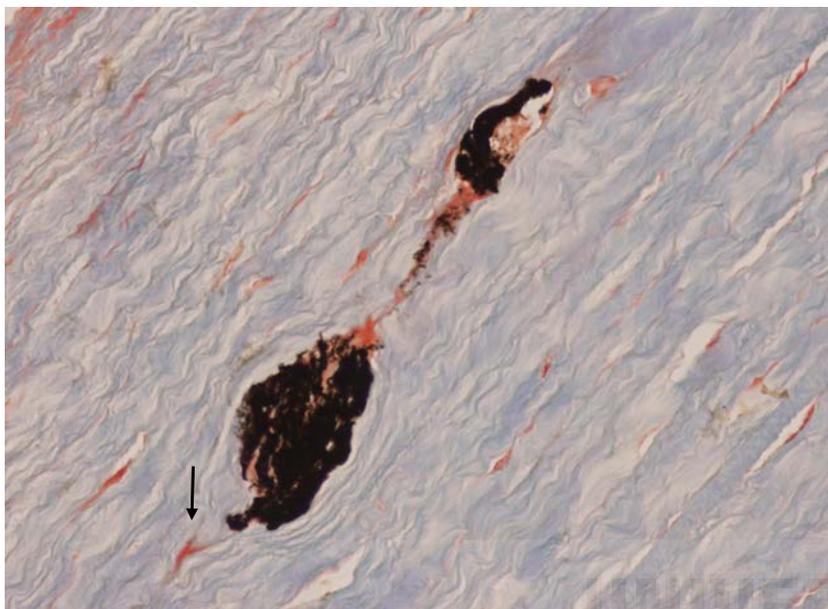


Figura:-42. Tricrómico de Masson (QTPB9). El pigmento permanece en el estroma, sin dispersión pero con disposición en cúmulos de variable tamaño. Alrededor del pigmento se reconocen queratocitos activados (flecha) y algunas células neuronales.

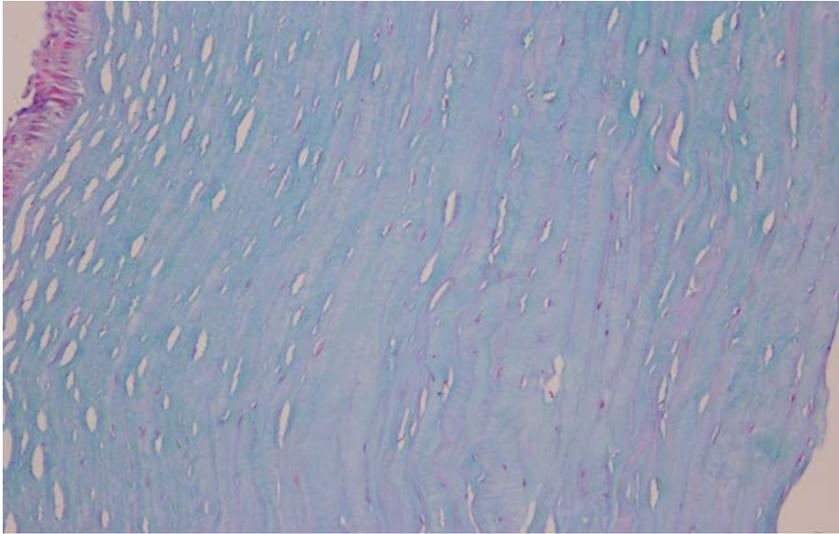


Figura:-43. Tinción de Azul Alcian. Note que no existen cambios en la matrix estromal.



Figura:-44. Tinción de Tricrómico de Masson (QTPB1) No se observa alteraciones en el colágeno estromal ni focos de fibrosis densa.

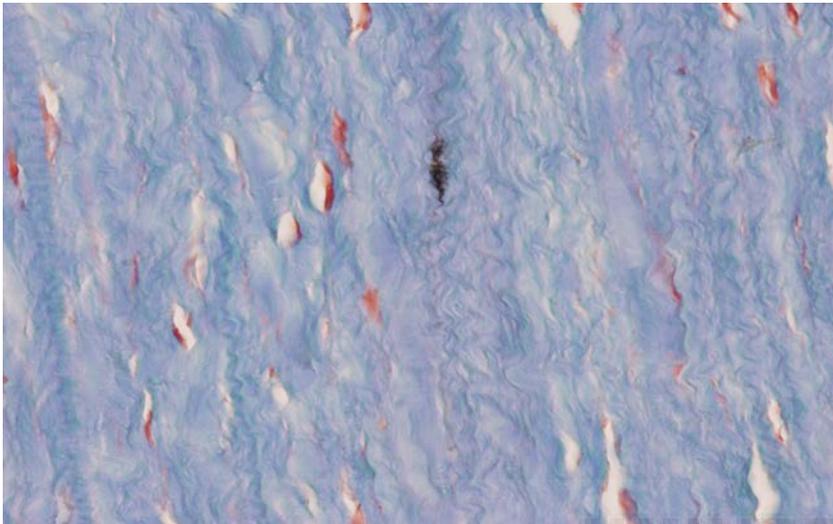


Figura:-45. Tricrómico de Masson. Note la disposición ondulada de las fibras colágenas. Queratocitos activados y pigmento. Microfotografía del ojo 4 del grupo C.

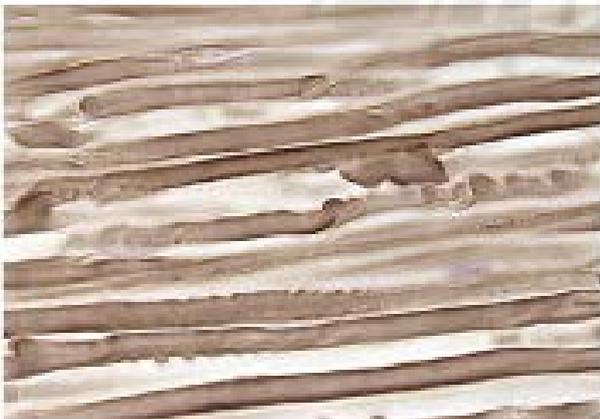


Figura:-46. Tinción inmunohistoquímica con anticógeno I, el predominante en el estroma corneal.

6-3:- Resultados del examen microscópico confocal.

En este estudio experimental en conejos se realizó, en todos los casos, microscopia confocal utilizando un instrumento Confoscan P4 (NIDEK), con una lente 40x. Se instiló VISCOTEAR – gel líquido – Novartis Farmacéutica S.A. Barcelona, España).

Evaluamos los ojos operados con tatuaje corneal (QTP) central, periférico y casos controles (con sólo incisiones y disección lamelar, pero sin inyección del pigmento).

En el caso de los ojos control, el examen reveló una córnea completamente transparente con reflectividad, epitelio y estroma (nervios incluidos) normales y endotelio corneal normal. Los queratocitos eran inactivos y normales en cuanto a su tamaño, densidad y distribución, (Figuras: 32, 33).

El examen microscópico confocal de los ojos tatuados (tatuaje central y periférico) puso de manifiesto una alta reflectividad al lado de los pigmentos en las capas del estroma medio; el epitelio superficial y el estroma eran normales y mostraban células epiteliales y lamelas estromales normales.

Aunque el estroma profundo subyacente (debajo de la ubicación del pigmento) no fue visible debido a la alta reflectividad del pigmento, cuando se realizó la microscopia confocal por segunda vez en el borde de la zona pigmentada, a fin de visualizar las capas corneales completas, los resultados fueron los siguientes: - aspecto normal de

todas las capas corneales, incluido el estroma profundo y, de un modo interesante, el endotelio.

En dicha tomografía también se observó con nitidez que los pigmentos estaban perfectamente localizados y que se limitaban a la zona del tatuaje, lo que puso de manifiesto que la fijación de los pigmentos era excelente, sin signos evidentes de dispersión o migración no deseada, ya sea a nivel superficial o en profundidad, incluso en el plano horizontal de la ubicación de los pigmentos. (Figuras:- 33,34, 35, 36).

Las tomografías de coherencia óptica también mostraron una córnea superficial y más profunda, sin aumento de la actividad de los queratocitos. En los conejos con córnea sana, la población de queratocitos fue:- $143,6 \text{ células/mm}^2 \pm 17,32$. En los conejos con córneas tatuadas, estos valores aumentaron hasta:- $162,4 \text{ células/mm}^2 \pm 11,35$. Este valor no fue estadísticamente significativo ($p=0,11$, Prueba T de Student)

Los nervios corneales fueron perfectamente visibles y no se alteró su morfología. En las córneas tatuadas no observamos células inflamatorias ni cicatrices ni reorganización de la matriz extracelular.

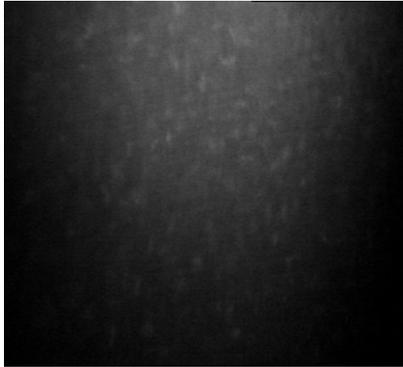


Figura 47. Estroma profundo con pigmento ojo control

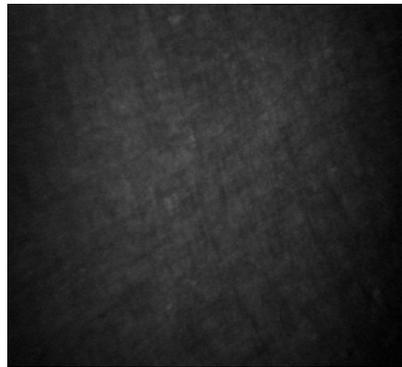


Figura:-48. Estroma profundo

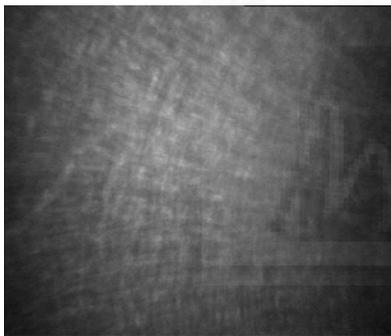


Figura:-49. Estroma superficial con pigmento.

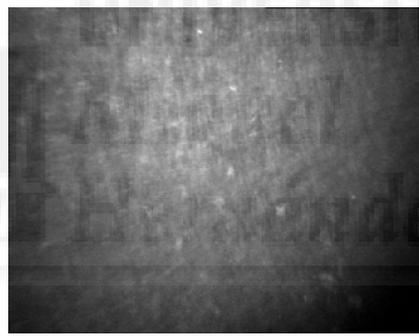


Figura:-50 Estroma superficial ojo control

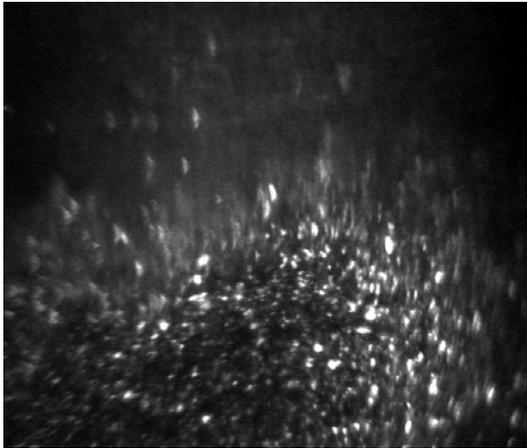


Figura-: 51. Estroma corneal medio con pigmento (visto mediante una alta reflectividad de la luz)



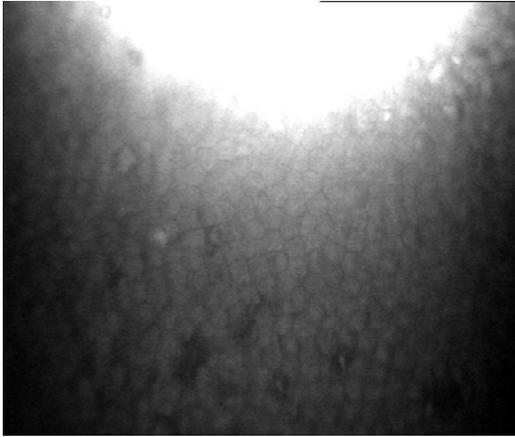


Figura:-52. Endotelio corneal (alta reflectividad del pigmento en el estroma medio)



Figura:- 53. Epitelio corneal (ojo tatuado)

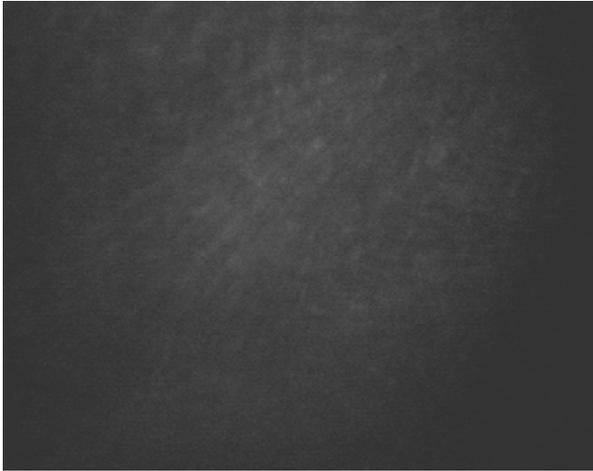


Figura:- 54. Estroma anterior (ojo tatuado)



DISCUSION



7 – DISCUSIÓN

Rara vez se aplica la queratopigmentación, QTP, (es decir, el tatuaje corneal), aunque es muy útil en grupos seleccionados de pacientes. Las indicaciones actuales incluyen indicaciones cosméticas y terapéuticas ⁽⁴²⁾. El procedimiento de QTP no es una técnica reciente o nueva para tratar una córnea cosméticamente desfigurada. En realidad, fue desarrollada hace muchos siglos como una técnica innovadora en su tiempo. Podemos decir que muchas décadas después, el procedimiento no fue tan popular y no obtuvo el reconocimiento de muchos cirujanos oftálmicos y de córnea de todo el mundo. Actualmente, la técnica de QTP con su nueva modificación ha comenzado a salir nuevamente a la superficie y ha llamado la atención de muchos cirujanos de córnea como una buena alternativa para proporcionar a un cierto grupo de pacientes un resultado satisfactorio para los trastornos corneales cosméticamente y psicológicamente incapacitantes que padecen. Creemos que en un futuro próximo dicha técnica ocupará su lugar en la práctica oftálmica, gracias a las nuevas modificaciones en los aspectos tanto de la maniobra misma como de los materiales utilizados.

Actualmente, la QTP se ha vuelto a poner en práctica con una aún más amplia variedad de indicaciones, no sólo como tratamiento cosmético sino también como una modalidad terapéutica, que tiene sus propias indicaciones en pacientes con buen potencial visual.

Desde este punto de vista, no podemos ignorar que la técnica de QTP ha ofrecido grandes beneficios desde su reciente llegada a la medicina oftálmica, al igual que todas las demás técnicas innovadoras.

De manera que disponer de productos inteligentes como, por ejemplo, la tecnología LASER de Femtosegundo y los instrumentos (cuchilletos Diamond, etc.) hizo posible introducir nuestro método de KTP nuevamente en el mercado, con nuevas técnicas y métodos de tatuaje quirúrgico. En nuestra opinión, este aspecto recientemente generado puede otorgar al procedimiento la capacidad y las motivaciones para que recupere su popularidad.

La queratopigmentación de cicatrices corneales cosméticamente desfigurantes y de leucomas o leucocoria puede ser una alternativa terapéutica valiosa y razonable para un grupo diferente de pacientes (Pitz S et al) ⁽⁴²⁾.

Este grupo está compuesto de pacientes en quienes los procedimientos quirúrgicos reconstructivos no darían lugar a una mejoría funcional ni supondrían riesgo de ptosis. Burris et al. describieron una técnica de tatuaje como una posible modalidad de tratamiento para ojos con visión en los que habría que corregir efectos ópticos, reducir deslumbramientos incapacitantes, y eliminar diplopías monoculares y fotofobia ⁽⁴²⁾ en pacientes con iridectomías importantes o pérdida traumática del iris ⁽⁴²⁾. En tal caso, el tatuaje de la zona con cicatrices, pero no de la pupila central, puede reducir el deslumbramiento y aumentar la agudeza visual, debido a que una cicatriz semitraslúcida se convierte en una placa total que causa un escotoma absoluto, también para mejorar los defectos cosméticos que resultan de defectos de iris simulados.

Más que la actitud renuente del paciente a someterse nuevamente a la cirugía {o evisceración y enucleación – (que es dolorosa y tiene efectos psicológicos y sociales)}, están las complicaciones bien

conocidas de la queratoplastia (trasplante de córnea) que darían lugar a: rechazo ⁽³²⁾, fallo del injerto ⁽⁴³⁾, alto riesgo de infecciones, entre otros.

De manera que, aún siendo una técnica segura con pocas incidencias de complicaciones, el procedimiento de QTP se puede realizar sin riesgo en los casos de traumatismo mecánico corneal grave, incluidas lesiones térmicas y químicas. Y debido a los variables resultados de la queratoplastia y la queratoprótesis, en la mayoría de los casos puede ser necesario tener que repetir muchos procedimientos de injerto, lo que posteriormente aumentaría las incidencias y las posteriores tasas de rechazo. Actualmente, podemos decir que el desvanecimiento del pigmento tatuado y la necesidad de rellenarlo no conlleva ningún riesgo y no precisa tratamiento tópico o sistémico a largo plazo. De manera que, en muchos casos, la aplicación de QTP puede evitar a los pacientes el riesgo de sufrir complicaciones intratables y ofrecerles un resultado seguro y satisfactorio con efectos a corto y a largo plazo, además de evitar que tengan que utilizar esteroides e inmunosupresores a largo plazo o incluso de por vida.

Existen tres opciones para mejorar el aspecto cosmético de córneas desfiguradas en ojos ciegos. La más sencilla consiste en utilizar lentes de contacto cosméticas blandas para reproducir una pupila negra; la segunda opción es el tatuaje corneal, y la tercera opción es el trasplante de córnea ⁽⁴³⁾.

La QTP puede llegar a ser una técnica importante (Pitz S et al.) ⁽⁴²⁾ y continúa siendo una intervención quirúrgica útil en el caso de leucomas con alto riesgo de PK, iris colobomy aniridia traumática en un grupo de pacientes bien seleccionado ⁽³²⁾.

Haciendo una revisión de los métodos de queratopigmentación, existen dos métodos de QTP completamente diferentes que ya se describieron en el último siglo. Uno de los métodos utilizados consistía en la tinción química con cloruro de oro o de platino, una técnica sencilla principalmente utilizada en Europa central ^(1,9). Otro método consistía en la impregnación de carbón. El tatuaje químico era más fácil y más rápido que el método de impregnación de carbón, pero se desvanecía más rápidamente que el tatuaje no metálico ⁽²⁹⁾. Más tarde se utilizaron tinta India, tinta China, negro de humo, y otros colorantes orgánicos ⁽²⁹⁾, pero los resultados finales no fueron del todo satisfactorios debido a que se formaban pliegues y con frecuencia era necesario repetir el procedimiento. ⁽⁵⁾

Aunque el antiguo método de impregnación parece ser problemático debido a una tinción irregular más bien impredecible ⁽¹³⁾, la resistencia a la decoloración a largo plazo⁽⁴²⁾ y la posibilidad de que se produzcan defectos persistentes en el epitelio corneal, la erosión epitelial repetida con ataques de dolor recurrentes o malestar, se entiende de la siguiente manera. La integridad de la membrana basal es esencial para mantener un revestimiento epitelial fuerte y sano de la córnea. El daño a esta membrana, ya sea mecánico, químico o traumático, se cita como causa de erosiones corneales recurrentes, una enfermedad intratable y dolorosa ⁽⁴⁴⁾.

Si sólo se retira el epitelio y se deja intacta la membrana basal, el epitelio se regenera en un plazo de 48 horas, alcanzándose una fuerte adhesión al estroma subyacente en siete días, ya que la membrana basal original se utiliza a tal fin. Sin embargo, en el caso de que también se retire la membrana basal, la adhesión requiere hasta ocho semanas para formarse completamente e incluso entonces es desigual y puede

no tener la fuerza original ⁽⁴⁴⁾. La membrana basal corneal actúa como un andamio para reemplazar ordenadamente la célula epitelial.

Cualquier anomalía traumática de la membrana basal debería comprender la unión entre el epitelio y el estroma y posiblemente podría dar lugar a trastornos erosivos recurrente. De hecho, cuando la membrana basal es dañada experimentalmente mediante cualquier técnica⁽⁴⁴⁾, las consecuentes secuelas incluyen irregularidades y defectos de la superficie epitelial. De manera que, como ejemplo de las complicaciones, en un artículo recientemente publicado sobre una complicación de la QTP, los autores describieron un caso de ablandamiento corneal tras el tatuaje corneal y presentaron un caso de ablandamiento del estroma corneal tras la aplicación de cloruro de platino para el tatuaje corneal con la técnica implicada en la extracción del epitelio corneal en la zona opacificada, el resultado fue satisfactorio y la afección se mantuvo estable durante el período de seguimiento de una semana después de seis semanas se observó un ablandamiento del estroma corneal de aproximadamente el 70% del grosor del estroma corneal, con un defecto subyacente del epitelio corneal. Las posibles explicaciones para la reepitelialización inicial y la posterior erosión pueden deberse a dos motivos: el primero – una escasa adherencia del epitelio a las zonas en las que se aplica el material del tatuaje, el segundo – una interferencia con migración de los nutrientes acuosos al epitelio corneal, debido a la función de barrera con muerte celular y esfacelación.

La pérdida del epitelio se puede asociar con niveles elevados de metaloproteinasas de la matriz debido a la activación de la producción de colagenasa por parte de los queratocitos, y la liberación por parte de células inflamatorias recientemente reclutadas^(37,38,39), con el posterior

ablandamiento del estroma. Sin embargo, se podrían considerar otras posibles causas como la reactivación de queratitis herpética estromal de grado bajo o infección fúngica ⁽³⁵⁾.

A partir de este caso o de las complicaciones descritas, no quedan claros los resultados finales de estas complicaciones, aunque se podría llamar una desventaja de la antigua técnica de queratopigmentación, en la que se eliminaba el epitelio y se impregnaba el estroma con pigmento, lo que no se describió ni sucedió antes de que se impregnara intraestromalmente el estroma con pigmento sin eliminar el epitelio corneal.

En todos nuestros casos, con las dos técnicas de tatuaje corneal (TCI intrastromal y TCS superficial) no observamos este tipo de complicaciones, y los resultados de estabilidad fueron excelentes.

La QTP intraestromal asistida por láser de femtosegundo permite obtener un perfilado más preciso de los bordes del túnel que la técnica intraestromal manual, dando un aspecto más natural a la pigmentación corneal.

Como ya se ha descrito anteriormente en la introducción, el principal hallazgo de Sekundo W et al., realizado en el estudio histopatológico de las dos córneas tatuadas, es el hecho de que en todos los casos se observaron gránulos en los queratocitos, al contrario de lo que ocurre en el tatuaje metálico de la córnea y en nuestro estudio histopatológico de las córneas tatuadas de conejo y cerdos (con ambas técnicas- TCI y TCS) utilizando pigmento micronizado mineral, lo que confirma este resultado. Asimismo, se observó que no se produjo migración no deseada de los pigmentos. Olande et al. demostraron que los gránulos

tanto intracelulares como extracelulares permanecían 10 años después del tatuaje ⁽²⁵⁾, y que los tatuajes permanecían macroscópicamente inalterados durante toda la vida del portador ⁽³⁵⁾.



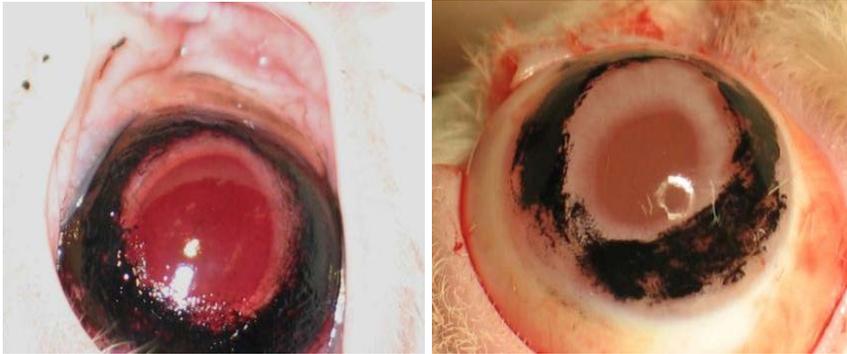


Figura:- 55 Fotografía de ojos de conejos con QTP periférica a los 3 meses (Izq) y a los 6 meses (Der). Notese la excelente permamnencia del pigmento negro. No se observan signos inflamatorios asociados.

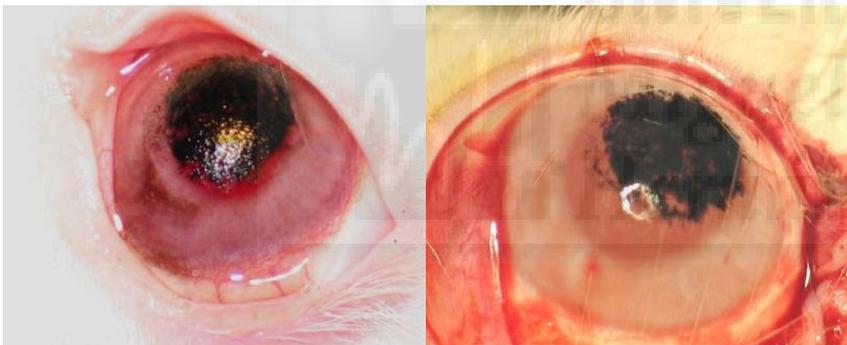


Figura:-56 Micropigmentación central. Foto Izquierda tomada a los 3 meses post QTP y la de la derecha a los 6 meses post cirugía. La pigmentación se mantiene excelente, sin decoloraciones ni signos inflamatorios añadidos.

Lea y Pawlowski atribuyeron estas características a la prominente red de elementos de tejido conectivo que rodea a los fibroblastos que contienen partículas de tinta ⁽³⁵⁾. En cambio, incluso en condiciones de fijación adecuadas, se ha descrito que la córnea tatuada con platino no

tenía membrana unitaria alrededor de las acumulaciones de las partículas del tatuaje ⁽²⁵⁾.

Aparte de la ubicación, otra clara diferencia entre los gránulos del tatuaje metálicos y no metálicos fue su aspecto ultraestructural. Sekundo et al. describieron que en todos los casos se detectaron gránulos oscuros (negros) y claros (grises) con bordes afilados angulados ⁽⁴²⁾. En cambio, Olander et al. observaron gránulos negros redondos con bordes parcialmente indiferentes ⁽²⁵⁾. La ausencia de partículas de tatuajes extracelulares en los casos de Sekundo et al. sugiere que la endocitosis de sustancias orgánicas por fibroblastos de córnea humana es más permanente y estable que la endocitosis de materiales metálicos ⁽²⁶⁾, en la que la ubicación extracelular se detectaba fácilmente ⁽²⁵⁾. En el estudio de Sekundo et al., estos resultados se confirman en córneas humanas tatuadas durante un período de tiempo significativamente más largo (hasta 61 años) ⁽²⁶⁾.

La decoloración del pigmento impregnado es un efecto secundario poco frecuente pero desconcertante. Mannis M J et al. describieron un buen ejemplo de un caso de esta complicación, el pigmento basado en hierro se oxidó con el tiempo al quedar expuesto a una combinación de oxígeno, agua y luz. El pigmento se encontraba en el estroma anterior y probablemente entró en contacto con fluidos y oxígeno del estroma corneal, por lo que su color cambió de marrón a naranja^(42,56). En nuestros resultados, y tal y como se indica en el apartado de resultados y métodos, el uso de pigmentos micronizados minerales no demostró que estos fenómenos ocurrieran.

Muchas de las complicaciones asociadas con la QTP están relacionadas al pigmento propiamente dicho tales como la hipopigmentación, el sobreteñido, desvanecimiento y cambios de coloración. Estos efectos no deseados, usualmente aparecen tras un período largo de tiempo (2 a 3 años) donde el retoque se hace necesario en la mayoría de los casos.

Los pigmentos minerales micronizados utilizados en nuestro estudio presentan una ventaja adicional sobre otros pigmentos naturales ya que el tamaño de sus partículas es reducido por procedimientos de micronización.

El pequeño tamaño de las partículas permite mejor tolerancia y biocompatibilidad, lo que disminuye la oportunidad de desarrollar reacciones inflamatorias a cuerpo extraño al pigmento introducido en la córnea (53).

No obstante, uno de los problemas del tatuaje corneal continúa siendo una configuración geométrica imperfecta ⁽²⁶⁾. Una nueva modificación del procedimiento de tatuaje, que puede eliminar el problema de la tinción irregular, fue recientemente publicada por Anastas et al. quien utilizó un láser Excimer para preparar un lecho corneal ideal circular y liso para el tatuaje ⁽²⁴⁾. Con la nueva generación de láseres Excimer (por ejemplo, la tecnología de puntos flotantes (*flying spot technology*) y las máscaras de ablación) se pueden conseguir ablaciones de diferentes perfiles ⁽³²⁾. En nuestro estudio se utilizó el láser Excimer en todos los casos.

Con la nueva generación de láseres Excimer (por ejemplo, la tecnología de puntos flotantes (*flying spot technology*) y las máscaras de ablación) se pueden conseguir ablaciones de diferentes perfiles ⁽³²⁾. En nuestro estudio se utilizó el láser Excimer en todos los casos.

El tutor de esta tesis y otros colegas, publicaron un artículo donde estudiaron 40 pacientes sometidos a cirugía reconstructiva donde usaron pigmentos minerales micronizados. Después de un año de seguimiento, solo ocho (8) pacientes requirieron una segunda QTP y un 95% de los pacientes estaban muy satisfechos con el procedimiento.

Una gran ventaja de los pigmentos minerales micronizados es el amplio rango de colores disponibles. Esto es muy conveniente en QTP ya que la meta principal es imitar lo más exacto posible el color natural del ojo del paciente y así obtener los mejores resultados cosméticos. La mezcla de diferentes pigmentos para obtener el tono y el color más semejante al color del ojo del paciente puede convertir a la QTP un procedimiento laborioso, además de consumir tiempo.

Afortunadamente, la infección microbiana es poco frecuente en queratopigmentación, ya que los resultados que obtuvimos en nuestros animales demuestran y confirman que la infección microbiana es poco frecuente ya que en ningún caso se produjo infección bacteriana. Van der Valden/Samderubun y Kok ⁽²⁰⁻²²⁾ enfatizaron la importancia de utilizar alicuotas separadas del pigmento de cada paciente, y utilizaron pigmentos comercializados que contienen un 80% de alcohol, una composición que consideraron contribuía a la baja incidencia de infección, éstos y la composición de estos pigmentos parece ser no tóxica para el ojo⁽⁴²⁾.

Holth et al. describieron resultados muy satisfactorios cuando utilizaron tinta para dibujo comercializada y esterilizada en diferentes tonos sin ningún efecto tóxico ⁽²⁾. Sekundo y colaboradores, como ya se mencionó anteriormente en la introducción, apoyaron recientemente esta evaluación de la tinta como un agente colorante bien tolerado en su evaluación histológica de muestras de hasta 61 años tras el tatuaje corneal⁽²⁶⁾.

Obviamente, estas tintas son superiores a la antigua tinta China, que es bien sabido que causa una inflamación considerable ⁽⁹⁾. No obstante, a pesar de estos artículos y de nuestra observación concerniente a la falta de toxicidad local, la composición de la tinta utilizada es un punto crucial. Por lo general, el pigmento colorante utilizado en este trabajo son pigmentos micronizados minerales y se componen de alcohol isopropílico 40%, agua 10%, glicerina 20%, dióxido de titanio C47-051 10-30%, óxido de hierro C33- 123 20-30%, indigold C37-038 15-30%, dianisidina-acetoacetanilida 20%, óxido rojo transparente 20%, verde L-

9361 20%, amarillo YT-858D 20%, azul 639-4433 20%. Debido a que la mayoría de estos componentes ya se han utilizado en medicina e investigado en dicho campo, se puede por tanto excluir la posibilidad de que se produzca absorción y toxicidad sistémica.

[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771069 - r16#r16](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771069-r16#r16)

Para la emulsificación, la mayoría de estas sustancias se utilizan por el contrario en cosméticos, fármacos, y alimentos ⁽⁴²⁾. Lo mismo sucede con la goma laca y el 1,6-hexanediol, que se añaden para hidratar: la goma laca se utiliza para recubrir píldoras y comprimidos ⁽⁴²⁾, mientras que se sabe que los polialcoholes como el 1,6-hexanediol son ingredientes de fruta

madura⁽⁴²⁾ [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771069 - r16#r16](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1771069-r16#r16)

En resumen, consideramos que los componentes de esta tinta no tienen o tienen muy poco potencial tóxico. En nuestros casos, como se puede ver a partir de los resultados y del seguimiento realizado a los animales experimentales, la queratopigmentación no dio lugar a ningún signo grave local o sistémico de toxicidad. La biocompatibilidad es excelente. – La Biocompatibilidad, se considera como la cualidad de un material de ser compatible con el entorno biológico, es decir, la capacidad del material para interactuar con los tejidos vivos, sin causar daño o muy pocas reacciones biológicas. ⁽⁵⁸⁾

Fujita et al. sugirieron que la fagocitosis de fibroblastos corneales es una reacción que protege la córnea de lesiones y daños de materiales extraños no tóxicos ⁽³⁰⁾. Suponiendo que las sales metálicas (también a nivel celular) son más tóxicas que las sustancias orgánicas utilizadas,

sería de esperar que se produjese una mayor degradación celular y posteriormente más residuos celulares en la matriz extracelular de la córnea. Por consiguiente, no resulta sorprendente que la probabilidad de gránulos extracelulares observados mediante microscopía electrónica es más alta en tatuajes metálicos que en tatuajes no metálicos.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo sobre la práctica de la QTP con pigmentos micronizados minerales y el primer artículo sistemático sobre el uso de la QTP Intraestromal con resultados estables. También hemos descrito el uso combinado de dos abordajes quirúrgicos: tinción de la superficie anterior (SCS) o introducción del pigmento directamente en el estroma corneal (ICS). Investigaciones previas han demostrado la buena tolerancia corneal a la QTP realizada con otros colorantes ^(30,46), aún cuando se describió un caso de queratitis granulomatosa ⁽¹⁵⁾, lo que demuestra que el seguimiento a largo plazo y los estudios como utilizando microscopía confocal se deberían realizar para establecer finalmente la tolerancia y la estabilidad de los nuevos colorantes para la QTP ⁽³⁰⁾.

Hay varias afecciones relacionadas con la acumulación de depósitos intracorneales, incluidas la queratopatía por amiodarona y los depósitos de hemosiderina en el epitelio. Ciancaglini y colaboradores describieron los hallazgos de la microscopía confocal en la córnea de pacientes con queratopatía inducida por amiodarona ⁽⁴⁷⁾.

Es característica la presencia de depósitos intracelulares muy reflectivos y brillantes localizados en las capas epiteliales, que son particularmente evidentes en las capas celulares basales ⁽⁴⁷⁾. Además,

mediante microscopia confocal se pueden observar líneas de hierro en la córnea en forma de brillantes inclusiones intracelulares, colocadas en la capa epitelial basal, cuyo aspecto es algo similar a los depósitos de amiodarona ⁽⁴⁷⁾.

No obstante, ninguno de estos depósitos corneales están agrupados o dentro del patrón geográfico del estroma superficial, y se pueden diferenciar claramente de los depósitos de tinta india mediante microscopia confocal *in vivo*.

De manera que en nuestro modelo de animales experimentales se realizó un examen con microscopia confocal (en ojos de conejos con córneas tatuadas – ambos grupos- tatuaje periférico y central, y en ojos control. Los resultados demostraron la presencia de partículas muy reflectivas en un patrón geográfico del estroma anterior para ambos grupos, en los que se realizó tatuaje central en el ojo derecho y tatuaje periférico en el ojo izquierdo utilizando pigmento negro micronizado mineral para la queratopigmentación.

También se observó que no había ningún queratocito en el estroma posterior y que los pigmentos no afectaron al epitelio ni el endotelio, lo que confirmó que, según se comenta en párrafos anteriores sobre la toxicidad de los pigmentos, no se observaron signos de toxicidad, y que no se produjo migración no deseada de los pigmentos a ninguna otra de las capas corneales – ninguna capa pigmentada superior o inferior del estroma anterior o medio en las que se impregnó pigmento micronizado mineral. Figuras: -(68-71)

En el caso del ojo control, el examen puso de manifiesto una córnea completamente transparente con epitelio normal, estroma normal incluidos los nervios y endotelio corneal normal. Los queratocitos eran inactivos, normales en cuanto a su tamaño, densidad y distribución, lo que significa que no se observaron diferencias en los resultados cuando utilizamos los ojos pigmentados y los ojos control.

Cuando se realizó microscopia confocal por segunda vez en el borde de la zona pigmentada a fin de visualizar las capas corneales completas, los resultados fueron los siguientes: - aspecto normal de todas las capas corneales, incluido el estroma profundo y de un modo interesante el endotelio.

En dicha tomografía también se observó perfectamente que los pigmentos estaban perfectamente localizados y que se limitaban a la zona del tatuaje, lo que puso de manifiesto que la fijación de los pigmentos era excelente, sin signos evidentes de dispersión del pigmento o migración no deseada del pigmento, ya sea a nivel superficial o de profundidad, incluso en el plano horizontal de la ubicación de los pigmentos. (Figuras: 38,39), por lo que podemos decir que no se observaron defectos ni ninguna característica tóxica, lo que confirma los resultados que se comentan en párrafos anteriores sobre la toxicidad y los defectos en el tejido de la córnea debido a la intervención quirúrgica y también a los pigmentos.

El tatuaje corneal puede ser un procedimiento utilizado para la corrección a largo plazo o permanente de las deformidades cosméticas del ojo en pacientes con cicatrices corneales desfigurantes. Durante el

seguimiento de este estudio se ha demostrado que el procedimiento es relativamente fácil, seguro y de larga duración.

Quisiéramos mencionar brevemente la importancia de que la mayor densidad del pigmento y su relativa permanencia se puede entender en nuestros casos debido a los métodos quirúrgicos de tatuaje corneal, en los que se tatúan simultáneamente dos superficies: el lecho del estroma corneal y la superficie interna del bolsillo se impregnan con el pigmento mineral micronizado, lo que por tanto duplica la cantidad de pigmento depositado en la córnea. Cuánto mayor es la cantidad de pigmento depositado en la córnea, mayor es la densidad del tatuaje y los resultados tienen una mayor duración. Esto ha sido confirmado mediante el examen histopatológico de las córneas tatuadas.

Además, con la QTP utilizada según se describe en esta investigación se consiguen resultados estables, muy satisfactorios, sin complicaciones ni toxicidad local o sistémica. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio la QTP es un procedimiento quirúrgico seguro, fácil de aprender y de realizar y no precisa el uso de materiales caros. Sus costes quirúrgicos son reducidos, ya que evita tener que recurrir a procedimientos de reconstrucción ocular más extensos e invasivos. A fin de comprender mejor los efectos biológicos a largo plazo en la córnea queratopigmentada con pigmentos micronizados minerales, es preciso realizar estudios adicionales sobre la estabilidad de los pigmentos descritos.

A partir de este estudio, en el que estudiamos tanto las técnicas de QTP (TCI, TCS), la técnica quirúrgica que utilizamos en la mayoría de los casos fue la TCI sin extracción del epitelio corneal, los resultados demuestran que esta técnica (QTP- TCS) presenta una tasa más alta de

éxito con mejores resultados durante largos períodos de estabilidad y que podría ser el posible tratamiento para grupos de pacientes cuidadosamente seleccionados.

Es necesario incluso comprender que todos los métodos y técnicas disponibles para mejorar el aspecto cosmético de los pacientes con cicatrices debido a lesiones en la superficie ocular se han de estudiar individualmente y con detenimiento a fin de elegir el método o técnica más óptimo.



CONCLUSIONES



8 - CONCLUSIONES

El fin de este procedimiento es la evaluación "in vivo", utilizando como modelo animal el conejo, de los efectos agudos y crónicos del uso de pigmento negro micronizado de Salvador Córdoba para su uso en córnea así como la optimización de la técnica quirúrgica y los aparatos más adecuados para llevar a cabo el procedimiento. El objetivo principal era inducir una queratopigmentación cosméticamente aceptable de la córnea, así como del entorno pericorneal y/o escleral.

Con la QTP utilizada según se describe en esta investigación se consiguieron estabilidad a largo plazo y resultados cosméticos satisfactorios con una alta satisfacción para los investigadores. La técnica se puede utilizar para el tratamiento cosmético de pacientes con cicatrices corneales desfigurantes (leucomas), así como terapéuticamente para el tratamiento de aniridia incapacitante. En este último caso no sólo se puede mejorar la visión, sino también se pueden tratar síntomas visuales como el deslumbramiento y la fotofobia y evitar la cirugía reconstructiva cosmética de alto coste e innecesaria. La calidad de vida de dichos pacientes se puede mejorar considerablemente mediante esta sencilla y eficaz técnica.

En conclusión, nuestro trabajo sugiere lo siguiente:

- La QTP es un procedimiento quirúrgico seguro, eficaz y útil.
- Fácil de aprender y de realizar.
- El procedimiento quirúrgico se puede realizar en ojos con función visual (con visión).

- No se produjeron complicaciones post quirúrgicas en ningunos de los conejos intervenidos.

- No hubo signos de toxicidad local ni sistémica en la totalidad de los animales. La vitalidad celular fue demostrada, no hubo cambios en la estructura celular que sugirieran alteraciones irreversibles ni signos de rechazo a cuerpo extraño.

- No se demostró dispersión del pigmento, inflamación ni angiogénesis en el estroma corneal

Con la queratopigmentación con pigmentos micronizados minerales utilizando la técnica de tinción corneal intraestromal (TIC) se consiguió una estabilidad a más largo plazo de los pigmentos y resultados satisfactorios, en comparación con la técnica de tinción corneal superficial (TCS).

Los pigmentos micronizados minerales se pueden utilizar sin riesgo, sin que se produzcan reacciones tóxicas adversas en las córneas tratadas.

Los pigmentos micronizados minerales tienden a permanecer en la capa estromal en la que se aplican, sin propagarse a los tejidos circundantes. Este hallazgo se confirmó mediante el examen histológico.

Las propiedades del color aplicado se conservaron perfectamente, no observándose cambio en la saturación del color al cabo de los 6 meses de estudio.

Con los parámetros utilizados de potencia y profundidad de alcance de las agujas no se produjeron perforaciones oculares ni otro tipo de complicaciones quirúrgicas.

La microscopia confocal es útil para investigar y estudiar córneas con leucomas o cicatrices, especialmente antes y después de la QTP.

Las ventajas de utilizar TCI en lugar de TCS se enumeran a continuación:

- El procedimiento es más rápido.
- Proporciona una pigmentación más homogénea de la córnea tratada.
- Postoperatoriamente, mayor confort para el ojo tratado (debido a que no se ha alterado la capa epitelial).
- El líquido lagrimal no tiene ningún efecto en el colorante utilizado, lo que da lugar a una mayor estabilidad del pigmento a largo plazo

BIBLIOGRAFIA



11 – BIBLIOGRAFIA

1. Mannis MJ, Eghbali K, Schwab IR. Keratopigmentation: A review of corneal tattooing. *Cornea* 1999; 18:633-637.
2. Holth S.-Revival of Galen's corneal staining with coppersulfate and tannine should be abandoned. *Am J Ophthalmol* 1931;14:378-379.
3. Van der Velden-Samdeerubun EM, Kok Jh. Dermatography as a modern treatment for colouring leukoma corneae. *Cornea* 1994; 13: 349-353
4. Ziegler, S. Multicolor Tattooing of the Cornea. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1922; 20: 71–87.
5. Taylor F. On the modern art of tinting opacities of cornea. *Br. Med. Jour.*, 1872; 9: 271.
6. Cofler T. Le tatouage de la cornee, tatouge chromatique, tatouage des paupieres. *Arch Ophthalmol* 1902; 19:606.
7. Tyson: *N. Y. Med. Rec.*, June, 1894, 709. *Wood's System of Ophthal. Operations*, 1911: 11, 1002.

8. Krautbauer F Tatowierung der cornea. Klin Monatsbl Augenheilkd 1928; 80:372.
9. Duke-Elder S, Leigh AG. System of ophthalmology. Vol VIII, In Disease of the outer eye, part 2, St Louis: CV Mosby 1965:645:8
10. Pickrell KL. Clark EH. Tattooing of corneal scars with insoluble pigments. Plast reconstr Surg 1947; 2:44-59.
11. Reed JW, Beran Rf. Elimintion of monocular diplopia by corneal tattooing. Ophthalmic surg 1988; 19:437-439.
12. Reed JW. Corneal tattooing to reduce glare in cases of traumatic iris loss. Cornea 1994; 13:401-405.
13. Gifford Sr. Steinberg A, Gold and silver impregnation of cornea for cosmetic purposes. Am J ophthalmol 1927; 10:240-24.
14. Pischel Dk, tattooing of the cornea with gold and platinum chloride. Arch ophthalmol 1930; 3:176-181.
15. Burris TE, Holmes-Higgin DK, Silvestrini TA. Lamellar intra-etromal corneal tattoo for treating iris defect (artificial iris). Cornea 1998; 17: 163-169
16. Panda A, Mohan M, Chandhary S. Corneal tattooing. Experience with lamellar pocket procedure. Indian J. Ophthaomol. 1984; 34: 408-414

17. Muller H, Van der Velden/Samderubun EM. Tattooing in maxillofacial surgery. J Craniomaxillofac surg 1988; 16:382-404.
18. Wiegmann E. Is tattooing according to Knapp entirely without danger? Am J ophthalmol 1929; 12:43.
19. Beekhuis WH, Drost B, Van der Velden/Samderubun EM. A new treatment for photophobia in post-traumatic aniridia: a case report. Cornea 1998;17:338-341.
20. Van der elden EM, de Jong BD, Van der Walle HB, Stolz E, Naafs B. Tattooing and its medical aspects. Int J Dermatol 1993 ;32:372-375.
21. Von Wecker L. Tatouage de la cornee. Union med 1870;27:41.
22. Wessels IF, Wessels GF. Mechanized keratocropigmentation: corneal tattooing with the blepharopigmentor, ophthalmic Surg lasers 1996; 27:25-8.
23. Rothschild L. Intracorneal tattooing on animals. Am J Ophthalmol 1918; 1:749
24. Anastas CN, McGhee CNJ, Webber SK, Bryce IG. Corneal tattooing revisited: excimer laser in the treatment of unsightly leucomata. Aust N Z J ophthalmol 1995; 23:227-230.
25. Olander K, Kanai A, Kaufman HE. An analytical electron microscopic study of a corneal tattoo. Ann Ophthalmol. 1983; 15: 1046-1049.

26. Sekundo W, Seifert P, Seitz B et al. Long term Ultrastructural changes in human corneas after tattooing with non-metallic substances. Br. J. Ophthalmol. 1999;83:219-224.
27. Hallock GG. Cosmetic trauma surgery. Plast Reconstr. Surg. 1995; 95: 380-381
28. Kuzan WM.Jr. Plastic surgery. J. Am Coll Surg. 1999; 188:171-177
29. Hoeyberhs JL, Fortnightly review: Cosmetic surgery. BMJ. 1999; 318: 512-516
30. Fujita H, Ueda A, Nishida T, et al. Uptake of india ink particles and latex beads by corneal fibroblasts. Cell Tissue Res 1987;250:251–255.
31. Takahashi J, Sakimoto T, Kitano S. The phagocytosis in the stroma of tattooed cornea. Atarashii Ganka. 1990;7:725-728.
32. Sekundo W. Refraktive chirurgie. In: Collins JF, Augustin AJ, eds. Augenheilkunde. Berlin: Springer Verlag, 1996:655–70.
33. Christensen HE, Schmidt H. The ultrastructure of tattoo marks. Acta Path Microbiol Scand 1972;80:573–6.
34. Fujita H, Nishii Y, Yamashita K, et al. The uptake and longterm storage of india ink particles and latex beads by fibroblasts in the dermis and subcutis of mice, with special regard to the non-inflammatory defence reaction by fibroblasts. Arch Histol Cytol 1988;51:285–94.

35. Lea PJ, Pawlowski A. Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis. *Int J Dermatol* 1987;26:453–8.

36. Al-Mezaine Hani S. Corneal Stromal Melting after Corneal Tattooing with Platinum Chloride. *Saudi Journal of Ophthalmology*, 2007; 21, 2:4-6

37. Fini ME, Cui TY, Mouldovan A, et al: An inhibitor of the matrix metalloproteinase synthesized by rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:2997-3001.

38. Fini ME, Girard MT, Matsubara M:Collagenolytic/ gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl*1992; 202:26-33.

39. Macartney A, Tschesche H: Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases .*J Biochem* 1983;130:71-78.

40. Web site;

http://www.nature.com/eye/journal/v20/n3/fig_tab/6701861f2.html

41. Web site;

<http://www.redatlas.org/RAPages/A/A145/A14500/A14500000.htm#top>

42. Pitz S, Jahn R, Frisch L, Dusis A, Corneal tattooing: an alternative treatment for disfiguring corneal scars, *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 397-399

43. Hollick EJ, Coombes A Lamellar keratoplasty and intracorneal inlay: An alternative to corneal tattooing and contact lenses for disfiguring corneal scars. *Br J Ophthalmol* 2006;90:127-252
44. Panda A, Mohan M, Chawdhary S. Corneal tattooing-experiences with "lamellar pocket procedure". *Indian J. Ophthalmol.* 1984; 32 : 408-411
45. McLean EN, MacRae SM, Rich LF. Recurrent erosion: treatment by anterior stromal puncture. *Ophthalmology* 1986;93:784-8
46. Custer PL, Kennedy RH, Woog JJ, et al. Orbital implants in enucleation surgery. A report by the American Academy Ophthalmology. *Ophthalmol.* 2003; 110: 2054-2061
47. Kobayashi Akira, Sugiyama, Kazuhira. In vivo Confocal Microscopy in a patient with Keratopigmentation (Corneal Tattooing). *Cornea.* March 2005, 24: 238-40
48. Khan BF, Harissi-Dagher M, Pavan-Langston D, et al. The Boston keratoprosthesis in herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol.* 2007;125:745-749.
49. Akpek EK, Harissi-Dagher M, Khan BF, et al. Outcomes of Boston keratoprosthesis in Aniridia: a multicenter study. *Am J Ophthalmol.* 2007;144:227-231.
50. Yaghouti F, Nouri M, Abad JC, et al. Keratoprosthesis: preoperative prognostic categories. *Cornea.* 2001;20:19-23.

51- Klintworth GK. Corneal angiogenesis. New York Springer Verlag; 1991:1-30.

52-Imre G. The role of increased lactic acid concentration in neovascularization. Acta Morphol Hung. 1984;32(2):97-103 (Medline)

53- Belucha S, Walewska A, Alio J, Klonowski P, Rodriguez A. Tolerance and biocompatibility of micronized black pigment for keratopigmentation simulated pupil reconstruction. Cornea 2011;30:344-350.

54- Alió L J, Rodriguez A, Toffaha B T, Piñero D, Moreno J L. Femtosecond-assisted keratopigmentation for functional and cosmetic restoration in essential iris atrophy. J Cataract Refract Surg 2011; 37:1744-1747

55- Kim JH, Lee D, Hahn T-W, Choi SK. New surgical strategy for corneal tattooing using a femtosecond laser. Cornea 2009;28:80-84

56- Kim C, Kim HC, Han YK, Wee WR, Lee JH, Kwon JW. Five year results of corneal tattooing for cosmetic repair in disfigured eyes. Cornea 2011; 30:1135-1139.

57- Novacoski R. Influencia de la Micronización de partículas en maquillaje. Cosméticos & Tecnología Latinoamérica. Vol. 1, julio- agosto 2010. www.cosmeticsonline.la

58- Black J. Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility (2ª Edition) Marcel Dekker Inc. New York; pg 8- 1982.



ANEXOS



CUADERNO de RECOGIDA de DATOS

Protocolo Experimental

Conejos A3 - CENIT

Efectos Agudos KTP

**Título del
Proyecto**

Estudio in vivo para el
desarrollo de pigmentos para
la queratopigmentación

Referencia

IOA-AA-004-09

Equipo: Prof. Jorge L. Alió

Alejandra Rodríguez

Amr ElAswad / Bader Toffaha

Alberto Artola

Severino Rey

Fecha: Julio 2012

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

[Type text]

Animales: 6 conejos (12 ojos)

Máquina: Stylus 3 con Puntas 5S

Potencia: 3.5 – 4.0

Procedimiento:

Realizar micropigmentación corneal superficial intentando reproducir la forma del Iris y de la pupila (según corresponda) con color Black 457.

Tratamiento postquirúrgico:

Oftacilox: 2 veces al día por 7 days.

Cicloplejico: 2 veces al día por 3 days.

Cloranfenicol pomada (Oftalmolosa Cusi): 2 veces al día por 7 days.

Buprenorfina 0,05 mg/kg (analgésico): 2/día por 2 días (Subcutánea).

Paracetamol 100 mg/100 ml: en el agua de bebida por 3-5 días.

Seguimiento:

Los animales se examinarán bajo lámpara de hendidura a 1 semana, y luego serán sacrificados y los ojos enucleados para estudio histopatológico.

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN	
Hiperemia conjuntival	0 = Ausente 1 = Leve 2 = Moderada 3 = Severa
Turbidez corneal	0 = Córnea clara 1 = Edema leve 2 = Edema corneal en mas de 2 cuadrantes de la córnea 3 = Enturbiamiento total de la córnea
Neovascularización corneal	0 = No vascularización 1 = Mínima neovascularización en córnea superior 2 = Neovascularización que no alcanza el centro de la córnea. 3 = Neovascularización que se extiende al centro de la córnea.

[Type text]

Defecto epitelial	Medido en mm, después de la aplicación de una gota de fluoresceína y observado con lámpara de hendidura.
--------------------------	--

MATERIAL NECESARIO PARA CIRUGÍA

- Anestesia intramuscular:
 - Ketamina 100 mg/ml (10ml) = 40 mg/Kg → Aprox 1 ml / conejo
 - Xilacina 20 mg/ml (20ml) = 10 mg/Kg → Aprox 1,5 ml / conejo
 - Buprenorfina = 0.05mg/Kg → Aprox 0,5 ml / conejo
 - Anestésico Doble Colircusi (Oxibuprocaina/Tetracaína)
 - Oftacilox
 - Cloranfenicol pomada (Oftalmolosa Cusi)
 - Cicloplejico
 - Fluoresceína
 - Jeringas 10 ml, 5 ml y 2ml
 - Agujas 21G y 23G
 - Hemostetas (muchas)
 - BSS indiv. y botella
 - Instrumental quirúrgico estéril
 - Paños quirúrgicos estériles
 - Gasa estéril (muchas)
 - Esparadrapo
 - Alcohol / Algodón
 - Marker fino y grueso
 - Guantes S sin talco
 - Guantes estériles 6 ½ y 7 ½ LAS
 - Betadine
 - Botes de orina
 - Calculadora
 - Tarjeta Video/Fotos
-
- Pinzas de córnea
 - Pinzas sin dientes instrumental
 - Pinzas comunes grandes
 - Bléfaro pequeño y mediano
 - Cubetas cuadradas de plástico estériles
 - Compás
 - Tijeras enucleación
 - Trépano grande (marcador cornea)
 - Trépano pequeño (marcador cornea)
 - Violeta (para marcar)

[Type text]

- Máquina Stilus 3
- Anioxide (limpieza maquina



[Type text]

- Pigmentos (Black 457)
- *Puntas de Stylus3 (5S)*
- Agua destilada estéril (botella)
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos estériles para lavar puntas
- Máquina de fotos
- Lámpara de hendidura portátil
- Pijamas quirófano (XL y L)
/Calzas



[Type text]

Cálculos para anestesia de Cirugía

Conejos Albinos. Eutanasia 8 días post KTP

CONEJO	PESO (gr)	KETAMINA (ml)	XILACINA (ml)	BUPRENORFINA
1	4.600	1.8	2.3	0.8+ 1ml postoperatorio
2	5.000	2.0	2.5	0.8+ 1ml postoperatorio
3	4.670	1.8	2.3	0.8+ 1 ml postoperatorio
4	4.800	1.9	2.4	0.8+ 1 ml postoperatorio
5	4.900	1.9	2.4	0.8+ 1 ml postoperatorio
6	5.500	2.2	2.7	0.8+ 1 ml postoperatorio

[Type text]

Seguimiento conejos.

Día 1 → CIRUGÍA 3 Julio 2012

CONEJO	OJO	COMENTARIOS
1	1-OD Central	Púpila marcada con tapón aguja 21G. PW=3. Profundidad media Leve enrojecimiento conjuntival 1hora.
	1-OI Perif.	PW=3.5 Profundidad media. No ha quedado uniforme. Enrojecimiento conjuntival moderado. Edema leve
2	2-OD Central	11.20am. PW=3 Profundidad media Se filmó video. Aspecto excelente.
	2-OI Perif.	11.30am. Se filmó video. PW=3.4 Profundidad media.
3	3-OD Central	12.02pm PW=4. Se filmó video + fotos. Profundidad media.
	3-OI Control	12.14pm. Se hicieron fotos.

[Type text]

CONEJO	OJO	COMENTARIOS
4	4-OD Central	12.40pm. PW=4. Profundidad media. Leve hiperemia conjuntival
	4-OI Perif.	13.02pm. PW=4. Profundidad media. Buen aspecto.
5	5-OD Central	13.25pm. PW=4 Profundidad media. Buen aspecto.
	5-OI Perif.	13.40pm. PW=4 Procedimiento sin complicaciones. Buen aspecto
6	6-OD Perif.	14.11pm. Todo Ok PW=4. Profundidad media
	6-OI Control	14.58pm.

[Type text]

Revisión → 5 julio 2012

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
1-OD Central T61=1.4	0	C=4x3mm	TC=0 NC=0
1-OI Perif. T61=	0	0	TC=0 NC=0
2-OD Central T61=1.5	0	C=3x3mm	TC=0 NC=0
2-OI Perif.	0	C= 1perif	TC=0 NC=0
3-OD Central T61=1.5	0	C=3x3mm	TC=0 NC=0
3-OI Control	/	/	Perfecto

[Type text]

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
4-OD Central T61=1.5	0	C=5x5mm	TC=0 NC=0
4-OI Perif.	0	+	TC=0 NC=0 Zona periférica de defecto > en zona inf central sobretodo el tauaje. Centro OK
5-OD Central T61=1.5	0	C=6x6mm +	TC=0 NC=0
5-OI Perif.	0	Defecto periférico +	TC=0 NC=0 Centro- Fluo
6-OD Perif.	2	Defecto periférico +	TC=0 NC=0 Sobre todo el tatuaje centro- Fluo-
6-OI Control	0	0	TC= 0 NC=0 Control2

[Type text]

Conejos. Revisión → 1mes KTP (30 días)

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
1-OD Central	1	0	Transparencia central=0 NV =0
1-OI Perif.	0	0	TC=0 NV=0
2-OD Central	2	0	TC=0 Defecto en línea NV=1
2-OI Perif.	1	0	TC=0 NV=0
3-OD Central	1	0	NV=1 TC=0
3-OI Control	1	0	/

[Type text]

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
4-OD Central	1	0	TC=0 NV=0
4-OI Perif.	0	0	NV=1 Mínima superior TC=0
5-OD Central	2	0	TC=0 NV=1
5-OI Perif.	0	0	TC=0 NV=0
6-OD Perif.	1	0	TC=0 NV=0
6-OI Control			

[Type text]

Revisión → Revisión 3 meses y luego eutanasia

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
1-OD Central	2		
1-OI Perif.	2		
2-OD Central	0		
2-OI Perif.	1		
3-OD Central	1		
3-OI Control	0		
CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS

[Type text]

4-OD Central	2		
4-OI Perif.	1		
5-OD Central			
5-OI Perif.	1		
6-OD Perif.	0		
6-OI Control	0		



[Type text]

**Revisión → 9 julio 2012. Eutanasia
(Agudos)**

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
1-OD Central			
1-OI Perif.			
2-OD Central			
2-OI Perif.			
3-OD Central			
3-OI Control			

[Type text]

Revisión → 6 meses post KTP y eutanasia

CONEJO	Hiperemia (0 a 3)	Defecto epitelial Fluo+ (mm)	COMENTARIOS
4-OD Central			
4-OI Perif.			
5-OD Central			
5-OI Perif.			
6-OD Perif.			
6-OI Control			

Leyenda: Tc Transparencia corneal, NC Neovascularización corneal, T61. Fármaco usado en la eutanasia

[Type text]



Fotografía de una mujer joven intervenida en Vissum Alicante. Se compara el aspecto clínico pre y postoperatorio. Imagen preoperatoria de la paciente (arriba) que fue sometida a KTP. Aspecto postoperatorio (inferior) donde se observa una excelente recuperación cosmética. Gentileza Prof. Alió.

Miguel
Hernández

[Type text]



[Type text]