

FACULTAD DE MEDICINA



QUERATOPIGMENTACION INTRAESTROMAL
UTILIZANDO PIGMENTOS MINERALES
MICRONIZADOS COMO MÉTODO DE TATUAJE
CORNEAL EN UN MODELO ANIMAL

AUTORA

Dra. Dña. M. Alejandra Amesty Morello

DIRECTORES

Prof. Dr. Jorge L. Alió y Sanz - Catedrático Universidad Miguel Hernández
Dr. José L. Encinas Martín - Profesor Titular Universidad Autónoma de Madrid

Madrid 2015

DEDICATORIA

A tu paciencia y comprensión,
sacrificando tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío.

Por tu fuerza de voluntad, constancia y sacrificio
me inspiraste a ser mejor persona y mejor oftalmóloga,
ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí,
gracias por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, con todo mi cariño y mi amor que han hecho todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A los directores de este proyecto.

Dr. Jorge Alió por la oportunidad y la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, siendo pilar fundamental, asesor y tutor en este trabajo.

Dr. José Luis Encinas, por su apoyo durante mis años de formación, convirtiéndose en el promotor de esta tesis doctoral.

A Laurent Bataille, Alejandra Rodríguez y a todo su equipo, así como a los trabajadores del animalario de la Universidad Miguel Hernández, que me ayudaron en este estudio, por su amistad y apoyo.

A mi farmacéutica particular, segunda madre y amiga, Maricarmen del Barrio, por estar pendiente siempre de todo y acompañarme a las revisiones con la fuerza que le caracteriza.

Y por último Jorge, gracias por tu apoyo en este proyecto y sobre todo gracias por hacerme feliz.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	8
1. INTRODUCCION.....	10
1.1. La queratopigmentación	10
1.1.1. Historia de la queratopigmentación	10
1.1.2. Desarrollo del procedimiento	11
1.2. Los trabajos de Ziegler	15
1.2.1. Selección de colores.....	15
1.2.2. Indicaciones para el tatuaje.....	19
1.2.3 Contraindicaciones del tatuaje corneal	19
1.3. Preparación para la Queratopigmentación	21
1.3.1. Preparación preliminar para la Queratopigmentación.....	21
1.4. Protocolo quirúrgico según Ziegler	22
1.4.1. Anestesia.....	22
1.4.2. Asepsia	22
1.4.3. Selección de los pigmentos de color	22
1.4.4. Esterilización de pigmentos o tintas.....	23
1.4.5. Instrumentos antiguos que se utilizaban para el tatuaje.....	24
1.4.6. Otros instrumentos históricos.....	25
1.5. Etapas de la Técnica quirúrgica de Ziegler	27
1.5.1. Primera etapa	27
1.5.2. Segunda etapa.....	28
1.5.3. Tercera etapa	29

1.5.4. Cuarta etapa.....	29
1.6. Más historia sobre el tatuaje corneal.....	30
1.7. Queratopigmentación en la actualidad	31
1.7.1. Pigmentos, técnicas, indicaciones y resultados en la actualidad.....	31
1.7.2. Técnicas de queratopigmentación en la actualidad.....	34
1.8. Indicaciones recientes para la pigmentación corneal.....	38
1.9. Resultados de la queratopigmentación.....	39
1.9.1. Resultados histológicos.....	39
1.9.2. Complicaciones de la queratopigmentación.....	42
1.10. Queratopigmentación, su anticipación en ojos funcionales.....	44
1.11. Tatuaje metálico y no metálico, estudio ultraestructural.....	45
1.12. El color de los ojos.....	48
1.12.1. Determinantes antropológicas.....	48
1.12.2. Determinantes genéticas.....	49
1.13. Técnicas utilizadas para el cambio de coloración de los ojos	50
1.13.1. Procedimientos cosméticos no invasivos.....	51
1.13.2. Procedimientos cosméticos invasivos.....	51
1.14. Ultimos estudios en queratopigmentación con fines cosméticos.....	52
1.14.1. Pigmentos minerales micronizados	53
1.14.2. Tolerancia y biocompatibilidad de los pigmentos minerales micronizados.....	54
1.14.3. Uso cosmético de los pigmentos minerales micronizados	55

2. JUSTIFICACION 57

3. HIPOTESIS 59

4. OBJETIVOS DE TRABAJO	60
5. MATERIALES Y METODOS	61
5.1. Estudio experimental en un modelo animal	61
5.1.1. <i>Materiales</i>	61
5.1.2. <i>Métodos</i>	63
5.1.3. <i>Procedimiento quirúrgico</i>	64
5.1.4. <i>Protocolo postoperatorio</i>	66
5.1.5. <i>Variables principales a estudiar en el experimento</i>	67
5.1.6. <i>Instrumental quirúrgico utilizado</i>	68
5.2. Estudio histopatológico en modelo animal	69
5.2.1. <i>Métodos</i>	69
5.3. Estudio microscópico confocal en modelo animal	70
5.3.1. <i>Materiales y métodos</i>	70
5.4. Estudio inmunológico del pigmento utilizado	71
5.4.1. <i>Materiales y métodos</i>	71
6. RESULTADOS.....	73
6.1. Resultados experimentales	73
6.1.1. <i>Primer experimento</i>	73
6.1.2. <i>Segundo experimento</i>	79
6.2. Resultados histopatológicos.....	82
6.3. Resultados histológicos. Análisis de cada color.....	92
6.3.1. <i>Grupo control</i>	93
6.3.2. <i>Grupo control "pocket"</i>	93

6.3.3 Grupos experimentales.....	94
6.3.4 Pigmento verde (muestras nº 1, 5, 7 y 13).....	95
6.3.4 Pigmento pardo verdoso (muestras nº 2, 6 y 14).....	98
6.3.4 Pigmento azul (muestras nº 4, 9, 11, 15 y 17).....	101
6.3.4 Pigmento pardo azulado (muestras nº 3, 12, 16 y 18).....	104
6.4. Microscopia confocal	109
6.5. Resultados inmunológicos.....	112
6.5.1 Inmunomarcaje del Antígeno Leucocitario Común.....	113
6.6. Resultados morfométricos	115
6.7. Método de simulación y catálogo de colores	117
7. DISCUSION	119
8. CONCLUSIONES	125
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	126

RESUMEN EN INGLES

Purpose: To study the tolerance and biocompatibility of micronized mineral pigments for corneal cosmetic pigmentation in an experimental animal model.

Methods: Corneal intralamellar keratopigmentation was performed in 28 New Zealand white rabbits using micronized mineral pigments. Prophylactic actions using intraoperative antibiotic prophylaxis and gamma radiation of the pigment mixtures were performed to avoid infection. Animals were examined regularly by slit lamp to detect any sign of inflammation, pigment diffusion, colour changes or neovascularization. Histopathological examination was performed to determine the level of pigment diffusion, the level of inflammation and the presence of neovascularization.

Results: No pigment diffusion or changes in color, inflammation or neovascularization were detected in the eyes treated. Histopathological examination corroborated clinical results regarding inflammation. Pigmented corneas showed a good cosmetic appearance without signs of ocular toxicity.

Conclusions: Micronized mineral pigments could be a valid alternative treatment for cosmetic keratopigmentation. Intralamellar keratopigmentation technique presented good cosmetic appearance without adverse effects in the eyes treated.

RESUMEN EN ESPAÑOL

Objetivo: Estudiar la tolerancia y la biocompatibilidad de los pigmentos minerales micronizados para la pigmentación corneal cosmética en un modelo experimental animal.

Métodos: Se procedió a la queratopigmentación intraestromal en 28 conejos blancos New Zealand, utilizando pigmentos minerales micronizados. Se tomaron medidas profilácticas preoperatorias utilizando radiación gamma de las mezclas de pigmentos y antibióticos intraoperatorias para evitar el riesgo de infección. Los animales fueron examinados regularmente en la lámpara de hendidura para detectar cualquier signo de inflamación, difusión del pigmento, cambios de color y/o neovascularización. Posteriormente se realizó un examen histopatológico para corroborar la presencia o ausencia de difusión de los pigmentos, valorar el grado de inflamación y la presencia o ausencia de neovascularización.

Resultados: No se observaron signos de difusión del pigmento o cambios en el color en ningún caso. Tampoco hubo evidencia de inflamación postoperatoria tardía ni neovascularización en los ojos tratados. El examen histopatológico mostró los mismos resultados que el examen clínico en lámpara de hendidura, en relación con la inflamación y neovascularización. Las córneas pigmentadas mostraron un buen aspecto cosmético sin signos de toxicidad ocular.

Conclusiones: Los pigmentos minerales micronizados podrían ser utilizados como alternativa válida para la queratopigmentación con fines cosméticos. La técnica de queratopigmentación intraestromal mostró un excelente resultado cosmético, sin efectos adversos derivados de la técnica o de los pigmentos utilizados en los ojos tratados.

1. INTRODUCCION

1.1. La queratopigmentación

1.1.1. Historia de la queratopigmentación

La práctica del tatuaje corneal o queratopigmentación no es ni mucho menos una nueva técnica quirúrgica. De hecho, ya en la antigüedad era practicada de forma muy rudimentaria. Durante siglos se ha utilizado esporádicamente para el tratamiento de las opacidades corneales.^(Holth 1931, Mannis 1999) El conocido médico y filósofo romano Galeno de Pérgamo (131-210 a.C.),^(Mannis 1999) fue el primero en describir el tatuaje corneal en el año 150 a.C., y es considerado el primer médico que pigmentó una córnea humana utilizando “sulfato de cobre reducido con agalla, para enmascarar un leucoma corneal de aspecto cosméticamente desagradable”.^{(Van}

der Velden-Samdeerubun 1994)



Figura 1: Galeno

Posteriormente lo hizo Aetius en el año 450 a.C. para intentar ocultar las opacidades corneales leucomatosas de los ojos. Ambos médicos, cauterizaban la superficie de la córnea con un estilete caliente. Después de la cauterización, procedían a aplicar el tinte sobre el ojo, usando una variedad de colorantes, tales como agallas en polvo y hierro. También utilizaron la corteza de granada pulverizada mezclada con sal de cobre.^(Ziegler 1922) Otras fuentes han mencionado que Galeno

podría haber usado el sulfato de cobre.^(Roy 1938) Este procedimiento era probablemente únicamente utilizado en aquellos pacientes con un leucoma corneal antiestético.^(Kobayashi y Sugiyama 2005)

1.1.2. Desarrollo del procedimiento

Después de Galeno, la práctica del tatuaje corneal no se menciona en la literatura hasta 1869, cuando el cirujano oculoplástico Louis Von Wecker introdujo un nuevo método. Se necesitaron catorce siglos para que Wecker, diseñara, utilizara y llevara a la práctica el método moderno del procedimiento. También fue el primero en utilizar tinta negra, también llamada tinta china (Indian ink) para tatuar un leucoma en el ojo. El autor primero aplicaba cocaína para anestésicar la superficie ocular y posteriormente cubría la córnea con una solución espesa de tinta, para luego insertar el pigmento con una aguja.^(Roy 1938) Este método ha influido en todos los métodos subsiguientes desde entonces.

Este autor consideró la técnica de la queratopigmentación cuando un estudiante suyo le formuló una pregunta sobre el posible tratamiento de un caso clínico.^(Ziegler 1922) Los detalles de estas técnicas y procedimientos de dicho estudiante fueron publicadas por el jefe de la clínica, Pomier de Pau, en 1870.^(Ziegler 1922) Posteriormente en 1872, Wecker reintrodujo el mismo principio pero con la aplicación de la tinta china (Indian ink).^(Ziegler 1922)

A lo largo de los años, 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, de dispositivos y diferentes métodos de aplicación.^(Mannis 1999)

Los primeros ensayos de los procedimientos estaban limitados al uso de tinta negra o tinta china, que los autores solían utilizar para rellenar la zona de la pupila, para delinear el círculo del iris y en algunas ocasiones, para tatuar los detalles anatómicos del iris. Durante la década siguiente, otros autores como Dunnage,^{(Ziegler}

1922) Taylor,^(Taylor 1872) Woinow,^(Ziegler 1922) Hasner,^(Ziegler 1922) y Archer^(Ziegler 1922) en Europa; y Levis,^(Ziegler 1922) Williams,^(Ziegler 1922) Thomson,^(Ziegler 1922) y Mathewson^(Ziegler 1922) en Norteamérica, intentaron realizar el tatuaje con pigmentos multicolores 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 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.^(Taylor 1872)

Es interesante mencionar que Levis, norteamericano de Filadelfia, fue el primero que defendió y puso en práctica el tatuaje con colores.^(Ziegler 1922) 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. La primera: La Fijación de los colores. La segunda: Las modificaciones que se producen en el tejido corneal. Y por último, la tercera: La distribución real de las partículas dispersas del pigmento que se produce tras la queratopigmentación.^(Ziegler 1922) Este autor descubre también la goma guta o *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 y pintores de la época la utilizan como un pigmento amarillo y en medicina se utilizaba como un catártico. Finalmente resultó ser un pigmento irritante produciendo inflamación y exfoliación poco después de utilizarla, lo que consecuentemente, tenía un comportamiento similar en la córnea, siendo expulsaba del tejido corneal.^(Ziegler 1922)

Sin embargo, las tintas de color azul ultramarino, la tierra de Siena y la tinta china 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 utilizar mejor un material colorante que fuese

químicamente puro, estable y que estuviese reducido a un polvo muy fino y pequeño. Utilizó cinco pigmentos diferentes: el carbonato de calcio, el carmín, el azul de Prusia, el ocre pálido y la tinta china.^(Ziegler 1922)

Más tarde, se realizaron estudios y se publicaron artículos por investigadores como Nieden ^(Ziegler 1922) de Bochum, Cofler ^(Cofler 1902) de Trieste, Holth ^(Ziegler 1922) de Cristiania y Polack ^(Ziegler 1922) de París, que enriquecieron enormemente el conocimiento práctico sobre este tema.

En 1901, Nieden de Bochum introdujo un método que utiliza una aguja de tatuaje basado en la idea de una pluma fuente o estilográfica, que se utilizaría con el bolígrafo eléctrico creado por Edison. Él encontró que esta aguja eléctrica tatuaba con mayor rapidez y regularidad que otros métodos tradicionales de tatuaje.

Por su parte Merck tuvo la idea de extraer un pigmento marrón de la coroides de un buey, pero se necesitaron 26 ojos para producir 232 miligramos de este pigmento marrón. Se encontró que este pigmento uveal era muy difícil de obtener, muy caro y que no ofrecía ninguna ventaja. 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 se producían con estos colores. En algunas personas el color conseguido con el pigmento ocre resultó satisfactorio y éste se reveló como un buen pigmento. Igualmente apoyó discretamente el uso del azul ultramarino y del azul de Prusia.^(Ziegler 1922)

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 la tinta china, 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.^(Ziegler 1922)

Por su parte, Holth fue también muy persistente e 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 en el delineado de los márgenes de la pupila y el círculo exterior del iris. Manifestó su prioridad en este aspecto, en comparación con Armaignac ^(Ziegler 1922) quien para tal fin utilizaba una guía larga y otra pequeña en forma de embudo (Figura 2) que se fijaba a la córnea por tres pequeños puntos salientes. A continuación, colocaba una porción de tinta china en el instrumento y procedía al tatuaje con una aguja. Armaignac afirmó que este método reproducía un círculo perfectamente redondo. ^(Ziegler 1922) Por su parte Czermak ^(Ziegler 1922) había utilizado previamente en 1896 el trépano de Von Hippel para delinear la pupila. Realizaba un raspado en el epitelio corneal de la zona pupilar antes de tatuarla con pigmento, que mezclaba con una suave solución de goma arábica como vehículo. ^(Ziegler 1922)

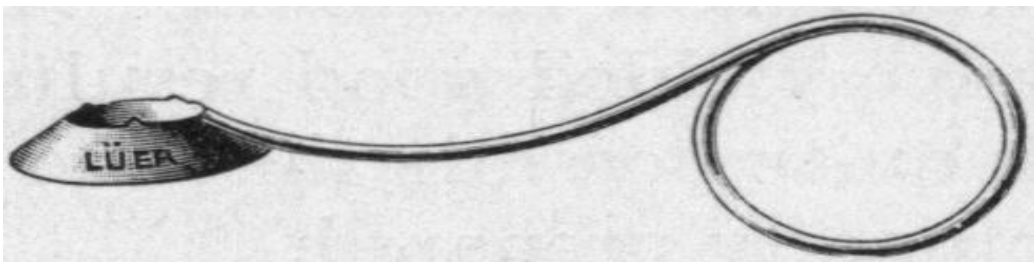


Figura 2: Anillo pupilar de Armaignac (Ziegler 1922)

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 polvos imperceptibles y estériles sin componentes irritantes. Este autor utilizó los colores negro humo, cinabrio, sepia, azul ultramarino, azul celeste (estaminato de cobalto), carbonato de calcio, tierra gris y arcilla blanca. Sin embargo 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, era posible que los productos disponibles con los que él contaba no se hubieran elaborado apropiadamente.^(Ziegler 1922)

A través de pruebas y estudios, Chevallereau y Polack observaron que una paleta de colores mejorada era más que necesaria. Manifestaron 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, debe 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 publicaron los distintos pigmentos de colores y establecieron cuáles se podían utilizar sin riesgos. Ziegler et al. probaron personalmente todos estos pigmentos y muchos más, afirmando que su paleta de colores se podía adaptar sin riesgo alguno.^(Ziegler 1922)

Otros médicos tales como Victor Morax, en realidad no llegaron a tatuar la córnea, pero si cambiaron la apariencia externa de la misma. Victor Morax dividiría el espesor corneal en dos capas verticales e introducía la sustancia colorante bajo el colgajo tallado. A continuación, aplicaba un vendaje compresivo sobre el ojo.^(Roy 1938)

Se puede observar según lo anteriormente planteado, que a lo largo de la historia se han introducido, ideado y desarrollado diferentes métodos para tatuar la córnea. Ellos han evolucionado conjuntamente a medida que se ha demostrado que son eficaces y han dado paso a los métodos convencionales que utilizamos en la actualidad.

1.2. Los trabajos de Ziegler

1.2.1. Selección de colores

Según Ziegler, cuando se eligen los colores para la queratopigmentación, se deberían escoger pigmentos cuyo origen sea mineral, indelebles, fáciles de esterilizar, no irritantes para la córnea, opacos a los rayos luminosos y mezclables

con el agua, pero no solubles. Los colores minerales son más permanentes que los colores vegetales cuando se aplican al tejido humano, pero está claro que son pigmentos irritantes.^(Ziegler 1922)

Hay pigmentos que no se deben utilizar, como por ejemplo el cromo, el cadmio, el cobalto y la goma guta. También se deben evitar sustancias químicas como el oxicianuro o el bicloruro de mercurio, ya que son peligrosas cuando se mezclan con los pigmentos.^(Ziegler 1922) El color del pigmento debe coincidir con el color del iris o puede ser un poco más fuerte, ya que es posible que se aclare un poco tras ser inyectado en la córnea.^(Ziegler 1922)

Tal y como demostró Hamilton,^(Ziegler 1922) la presencia de una cápsula de bacilo en las tintas chinas acentúa la necesidad de esterilización. 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.^(Ziegler 1922) De igual forma, los pigmentos deben ser lo suficientemente opacos para oscurecer el leucoma o para interceptar los rayos luminosos en albinos, en presencia de coloboma o queratocono, y no deberían irritar la córnea cuando se apliquen.^(Ziegler 1922)

Como se ha mencionado anteriormente, 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 la inflamación producida por irritación a sustancias químicas; (b) mediante una lenta migración, y (c) mediante solución parcial.^(Ziegler 1922)

De acuerdo con Browicz,^(Ziegler 1922) Hirschberg,^(Ziegler 1922) y Poncet ^(Ziegler 1922), los depósitos de pigmento 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,^(Ziegler 1922) Parsons,^(Ziegler 1922) Terrien,^(Ziegler 1922) entre otros, confirmaron estas observaciones.

Para realizar una presentación gráfica de la paleta de pigmentos (Figura 3), de su composición química y de las combinaciones necesarias para obtener el tono deseado de color del iris, Ziegler elaboró las siguientes tablas de pigmentos (Tablas 1 y Tabla 2).

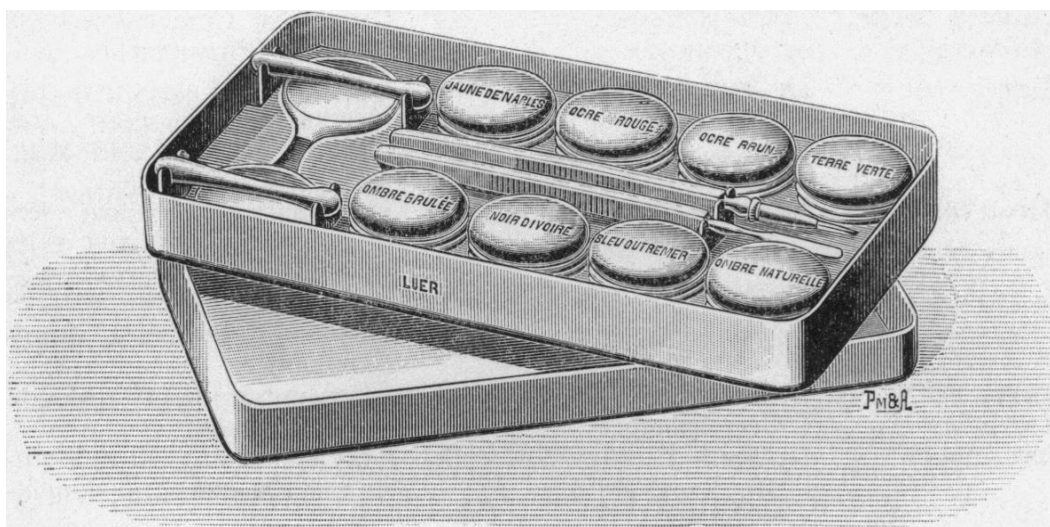


Figura 3: Paleta de pigmentos (Ziegler 1922)

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: Paleta de pigmentos con su composición (Ziegler 1922)

Ziegler describió que el Amarillo Nápoles es un pigmento más útil que el blanco zinc para corregir un defecto, ya que permite cubrir dicho error mediante el procedimiento de tatuaje con color. También observó que el pigmento verde tierra no es un pigmento tan estable como debería ser, aunque puede ser muy útil cuando se mezcla de forma correcta con la mayoría de los colores, ya que cuando dicho color se añade al color marrón, parece crear un aspecto más natural. Por su parte el rojo ocre se puede mezclar con el negro marfil para crear casi cualquier tono de marrón. (Ziegler 1922)





COLOUR TONE	PIGMENTS REQUIRED	
Yellow	Naples yellow	
Light green or greenish blue	Green herat	
Light blue	Ultramarine blue + Naples yellow	
Dark blue	Ultramarine blue	
Light brown or yellow	Brown ochre	
Yellow brown	Brown ochre + Green herat	
Red brown	Red ochre	
Brown	Raw umber	
Greenish Brown	Raw umber + Green herat	
Dark brown	Burnt umber	
Very dark brown	Burnt umber or Red ochre + Ivory black	
Black (pupil)	Ivory black or Indian ink	

Tabla 2: Tonos de colores para simular colores de iris y pigmentos requeridos para cada tono (Ziegler 1922)

1.2.2. Indicaciones para el tatuaje

El objetivo principal del tatuaje corneal es uno de los siguientes, el objetivo cosmético, el objetivo óptico o ambos. ^(Ziegler 1922)

Las indicaciones para el tatuaje con fines cosméticos según el estudio de Ziegler son las siguientes:

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. Leucomas vascularizados, sólo en casos de que estén controlados con adrenalina.
5. Ptisis bulbi, tras tenotomizar los músculos rectos para producir exoftalmos compensador como lo plantea Wecker. ^(Wecker 1870)
6. Para disimular la leucocoria secundaria a catarata, en caso de que no se pueda operar.

Las indicaciones para el tatuaje con fines ópticos según el estudio de Ziegler son las siguientes:

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.

1.2.3 Contraindicaciones del tatuaje corneal

Entre las contraindicaciones para el tatuaje, ya sea con fines ópticos o con fines cosméticos se encuentran las siguientes. ^(Ziegler 1922)

1. Leucoma adherente ya existente (en caso de que el iris esté expuesto).
2. Iridociclitis.
3. Estafiloma.
4. Algunos casos de glaucoma.
5. Algunos casos de irritación o inflamación.
6. Depósito calcáreo.
7. Queratitis cicatricial.
8. Enfermedad lacrimonasal.
9. Conjuntivitis crónica.

Es importante resaltar que a partir de 1872, Wecker enfatizó en la necesidad de realizar un tatuaje con fines ópticos 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. De tal forma se vió que algunos problemas de visión borrosa y de difusión de rayos dispersos producían deslumbramiento al paciente. Para resolver esta interrogante, Wecker realizó un experimento en el que creó una pupila estenopeica hacia abajo y hacia adentro, y cubrió la córnea central con pigmento negro opaco.^(Ziegler 1922)

En 1907, Mayeda ^(Ziegler 1922) de Nagoya en Japón, realizó algunos experimentos fotográficos con un color negro opaco y una lente Zeiss de diafragma de 15 mm, para lo que primero untó la lente de la cámara con una pasta y luego cubrió la pasta con negro opaco, demostrando gráficamente lo siguiente:

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 de negro opaco con una zona de pasta translúcida cubierta de negro opaco = imagen clara.

De esta forma, Mayeda determinó que cuando aplicaba el negro opaco, la definición volvía 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.

1.3. Preparación para la Queratopigmentación

Cuando se realiza el procedimiento de tatuaje de la córnea o del globo ocular, los pasos a seguir según Ziegler son los siguientes.^(Ziegler 1922)

1.3.1. Preparación preliminar para la Queratopigmentación

El buen juicio indicaría que cada contraindicación se tenga en cuenta antes de intentar realizar el tatuaje.^(Ziegler 1922)

En caso de conjuntivitis crónica, se debería instaurar un 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 antes del procedimiento, coagulándolos 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 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.^(Ziegler 1922)

Pontius ^(Von Wecker 1870) sugiere la utilización de adrenalina (1:1000) a fin de fortalecer y regenerar la córnea debilitada. Esto es particularmente aplicable en los casos de estafiloma y queratocono agudos. En el caso de una ptisis bulbi que sea silenciosa, vale la pena considerar la sugerencia de Wecker de provocar una "exoftalmia compensada" realizando un procedimiento sobre los músculos rectos poco antes del tatuaje. En los casos en los que la conjuntiva se haya contraído sobre la córnea, es posible blanquearla con adrenalina para poder así delinear el círculo periférico del iris sobre la conjuntiva isquémica e imitar con más detenimiento el ojo sano.^(Von Wecker 1870)

1.4. Protocolo quirúrgico según Ziegler

1.4.1. Anestesia

La anestesia se consigue con inyecciones hipodérmicas de hioscina y de morfina o mediante inyecciones de Novocaína.^(Ziegler 1922)

1.4.2. Asepsia

Se debería mantener la asepsia mediante la irrigación libre, tal y como se realiza en otras operaciones del ojo con solución estéril de ácido bórico.^(Ziegler 1922)

1.4.3. Selección de los pigmentos de color

El cirujano desea igualar lo máximo posible el color del ojo enfermo al color del ojo sano, de manera que se debería estudiar con detenimiento: el tamaño de la pupila, el tamaño y el color del círculo del iris, los tipos de radiación del iris, y el color exacto del estroma del iris. Estos colores se pueden mezclar secos y mantenerlos conservados para el otro ojo y así asegurar que los colores sean iguales. El tamaño de la pupila también debería coincidir y producir la misma respuesta a la exposición

a la luz del día que la del ojo sano, y al determinar el tamaño de la pupila nunca deberá exceder los 3 ó 4 mm; de lo contrario, parecería que el ojo con el tatuaje corneal está mirando fijamente. El negro marfil acaba siendo un negro plano o muerto, mientras que la tinta china es ligeramente transparente, lo que podría proporcionar un brillo más natural a la superficie. En algunas ocasiones, Ziegler utilizó la tinta India en ampollas estériles que un químico parisino (Guillaumin) le preparaba.^(Ziegler 1922)

1.4.4. Esterilización de pigmentos o tintas

Ziegler prefería utilizar los pigmentos franceses en polvo y la esterilización se debería realizar con resina purificante, aclarar con alcohol, éter y agua para eliminar otras impurezas. El polvo restante se debería tratar con éter, lo cual produce finos granos de polvo y hace que los granos gruesos se desprendan de los granos finos. Estos granos finos se decantan posteriormente y se secan encima de un baño de arena, lo que a cambio, deja un polvo impalpable. Después de todo este trabajo, se esteriliza el polvo y luego se mezcla con agua estéril y posteriormente se esteriliza en seco en un esterilizador de vapor a una temperatura de 150°C antes de utilizarlo.^(Ziegler 1922)

Para ayudar en el mezclado, se utilizan un plato de porcelana y un pequeño mortero de vidrio. La espátula de metal flexible de Wecker se suele sustituir por dicho mortero de vidrio.

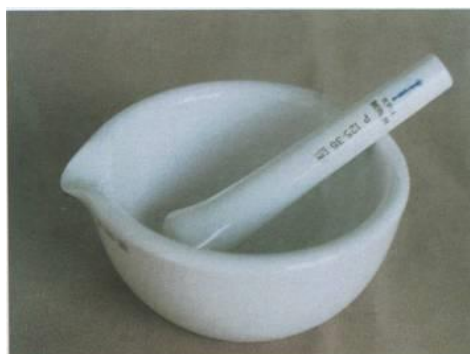


Figura 4: Plato de porcelana y Mortero

Por ejemplo, en el caso de la tinta china, ésta se utiliza en forma de ladrillo o bastoncillo, igual que en el método de Wecker (Figura 8). Se debería "rebanar" con un cuchillo afilado o "rallar" con un rallador de acero. Posteriormente se puede esterilizar a la vez que se seca en un esterilizador eléctrico, hasta una temperatura de 1500°C, y seguidamente se mezcla en una pasta con agua estéril en una placa de porcelana con una espátula de metal de Wecker, o se puede mezclar primero para hacer una pasta y esterilizar posteriormente en un esterilizador de vapor.^(Ziegler 1922)

A la pasta se le puede añadir una gota de glicerina y un poco de agua de acacia. En ocasiones, el cirujano puede preferir suavizar el extremo de su bastoncillo de color humedeciéndolo en agua estéril. Los pigmentos policromo generalmente se utilizan en una solución más delgada que el negro, ya que el estroma del iris no necesita la opacidad de la pupila. De esta forma, la tinta ya está lista para ser utilizada en el tatuaje del globo ocular o de la córnea.^(Ziegler 1922)

1.4.5. Instrumentos antiguos que se utilizaban para el tatuaje

Wecker dejó de utilizar su propia aguja única acanalada (Figura 6) y comenzó a utilizar las agujas de Taylor compuesta por varias agujas (Figura 5) (dos, cinco u ocho agujas), que desde entonces llevan el nombre de Wecker. Por su parte, Ziegler prefería utilizar sólo dos agujas. En el otro extremo del mango se coloca la espátula de metal de Wecker, que es útil tanto para mezclar la pasta de color como para aplicarla en la córnea. Sin embargo Agnew prefería utilizar cuatro agujas largas colocadas en tándem (Figura 7).

Tyson ^(Ziegler 1922) ha mejorado esta técnica utilizando agujas más cortas colocadas en una matriz sólida para evitar perforar la córnea. Sin embargo, Thomson utilizó para este fin el bolígrafo de "Gillott's Crow - Quill Lithographic Pen." Invirtió la posición del dispositivo (cabeza abajo) a fin de conservar tinta de reserva para realizar el tatuaje completo, igual que una pluma, y mezcló su pigmento con

glicerina. Borsch,^(Ziegler 1922) quien anteriormente fue el jefe de la clínica de Wecker, no se equivocó al afirmar que únicamente se debería utilizar una única aguja para realizar el trabajo más delicado, como en los casos de tatuaje óptico para las nébulas u opacidades difusas, para delinear el círculo del iris, o para dibujar detalles del estroma del iris.^(Ziegler 1922)



Figura 5: Aguja de tatuaje de Taylor (Ziegler 1922)

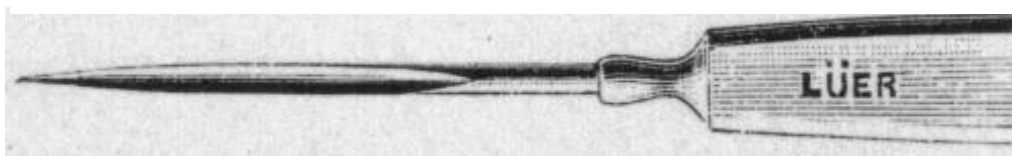


Figura 6: Aguja acanalada de tatuaje de Wecker (Ziegler 1922)

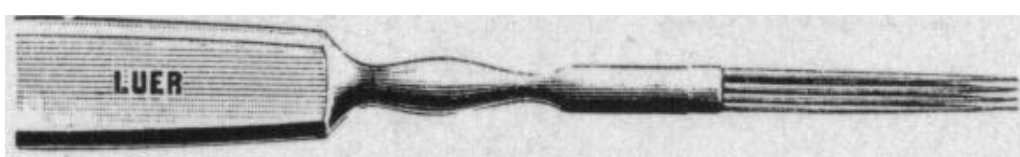


Figura 7: Aguja de tatuaje de Agnew (Ziegler 1922)

1.4.6. Otros instrumentos históricos

Ziegler quiso presentar una aguja eléctrica como dispositivo de tatuaje de su propio diseño, que había realizado a partir de un instrumento dental y, por tanto, tenía la fuerza suficiente para guiar el pigmento a través del epitelio corneal. Ya no se comercializaba el bolígrafo eléctrico o Neostyle de Edison utilizado para perforar una hoja de papel que se utilizaría como colorante para el mimeógrafo, pero los pocos dispositivos que tuvo la oportunidad de examinar le permitieron demostrar su capacidad para el tatuaje eléctrico.

Otro instrumento utilizado es el raspador dentado de Skeel o Ziegler, el cual se puede utilizar para realizar la técnica de Czermak o Holth. Tanto Czermak como Holth realizaban la extracción del epitelio de la superficie corneal de la zona pupilar. Con la escarificación oblicua o con el cuchillo reticulado se conseguirá un propósito

similar. Por su parte, Frohlich ^(Tyson) cortaba la capa superficial de la córnea con un queratomo o cuchillo utilizado para la cirugía de catarata, pero Holth afirmaba que el color del tejido cicatricial expuesto modificaba la pupila negra tatuada a un tono azulado.

Un inconveniente a tener en cuenta es que no se pueden utilizar instrumentos con pinzas o dientes de fijación, ya que la sujeción de los dientes se llenaría inmediatamente de pigmento. Las pinzas de depilar se pueden utilizar para sujetar el recto superior y mantener el ojo firme. Sin embargo, Ziegler prefería utilizar un anillo de fijación de 11 mm diseñado por él (Figura 8), el cual se fija al limbo y se divide en cuadrantes fijados a un anillo pupilar de 3,5 mm. Sus bordes son lo suficientemente afilados para evitar que el globo gire y al mismo tiempo sirven para cortar la córnea como un trépano, consiguiendo delinear tanto la pupila como el círculo periférico del iris. Es posible confinar el pigmento a un único cuadrante y poder trabajar así rápida y eficientemente. En una amplia superficie a tatuar, sería más sabio limitar nuestra coloración a sólo un cuadrante cada vez. Si se prefiere un trépano corneal, se puede utilizar el trépano mecánico de von Hippel o Mackay, pero el trépano manual de Elliot o Ziegler suele ser suficiente. Si se desea un trépano para la zona pupilar, éste se puede introducir a través de un anillo de fijación. El trépano doble de Barck también se puede utilizar para delinear la zona de la pupila y el círculo del iris.

Con cualquiera de estos métodos se obtendrá una pupila centrada con exactitud, lo que es imprescindible. ^(Ziegler 1922)

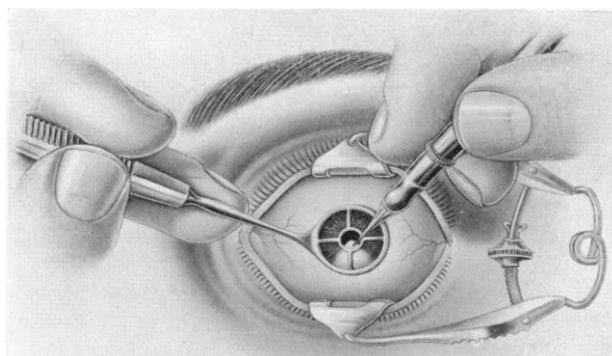


Figura 8: Anillo de fijación de Ziegler y pluma fuente de Nieden ^(Ziegler 1922)

En 1907, Hesse ^(Ziegler 1922) mientras ejercía como jefe de departamento en Dimmer, comenzó a separar y a levantar el colgajo trepanado con un queratomo y colocar una capa debajo antes de reemplazarlo. Magitot ^(Tyson) mejoró esta técnica autoplástica dejando el colgajo adherido a un borde, igual que en una puerta de ventilación, y utilizando cuchillos paralelos de forma similar para extraer los colgajos periféricos, debajo de los cuales esparció el pigmento. Ciertamente, ésta es una técnica sencilla y eficaz cuando la córnea es lo suficientemente gruesa para permitirlo. ^(Ziegler 1922) Cortar la córnea de esta forma indudablemente adelgaza y debilita la córnea, pero la regeneración de la cicatrización puede volver a engrosar la córnea e incluso aumentar su fuerza. ^(Ziegler 1922)

1.5. Etapas de la Técnica quirúrgica de Ziegler

1.5.1. Primera etapa

Lo primero a tener en cuenta es que para una correcta técnica quirúrgica una brillante y buena iluminación siempre es necesaria. El espéculo de Ziegler se utiliza porque mantiene el párpado alejado del globo ocular. Presionando el anillo de fijación al limbo (Figura 8) contra la córnea con la mano izquierda, el trépano se

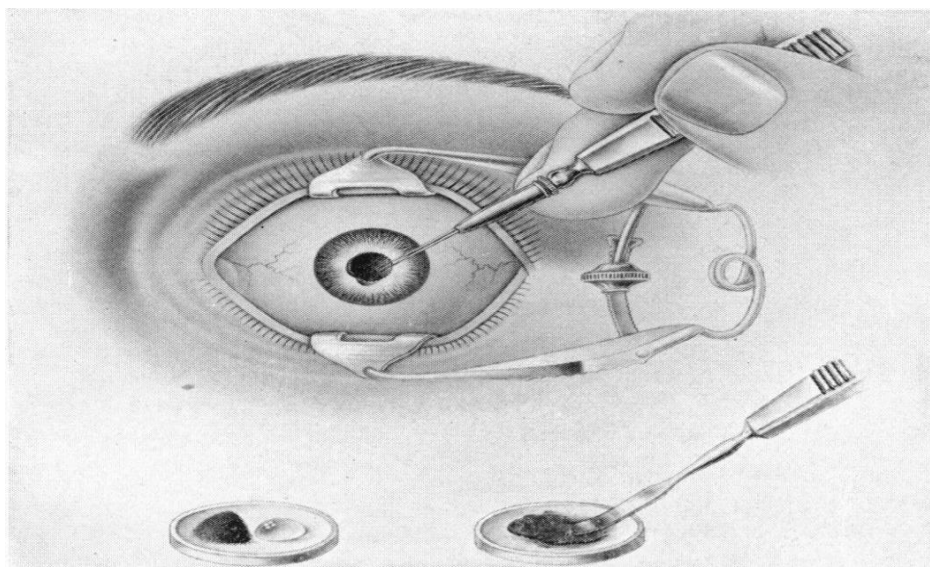


Figura 9: Tatuando la pupila, método de Wecker. Abajo izquierda: Tinta india (en rebanada o rallada) con una gota de agua. Abajo derecha: Mezclando la tinta con la espátula (Ziegler 1922)

aplica suavemente a través del anillo central para delinear la zona de la pupila, tras lo cual se puede escarificar o raspar la superficie del epitelio. Si se prefiere, el margen de la pupila se puede delinear sólo con la aguja de tatuaje como se ilustra en la Figura 9. (Ziegler 1922)

1.5.2. Segunda etapa

Para cubrir la zona de la pupila (Figura 9) se utilizan (a) la aguja eléctrica o la pluma fuente las cuales contienen su propia tinta; o (b) la pasta del pigmento negro, el cual se extiende encima de la zona de la pupila con la espátula de metal y posteriormente con la aguja de tatuaje se inyecta rápidamente la pasta en la córnea leucomatosa, primero verticalmente y luego oblicuamente. (Ziegler 1922)

Cuando la superficie corneal parece estar completamente cubierta e impregnada, se debe irrigar para ver si se necesita más pigmento. Si quedan algunos espacios sin tatuar, se utilizará la espátula de metal para frotar la pasta del pigmento, se repiten los pinchazos con la aguja y se irrigará la superficie igual que se había realizado antes. (Ziegler 1922)

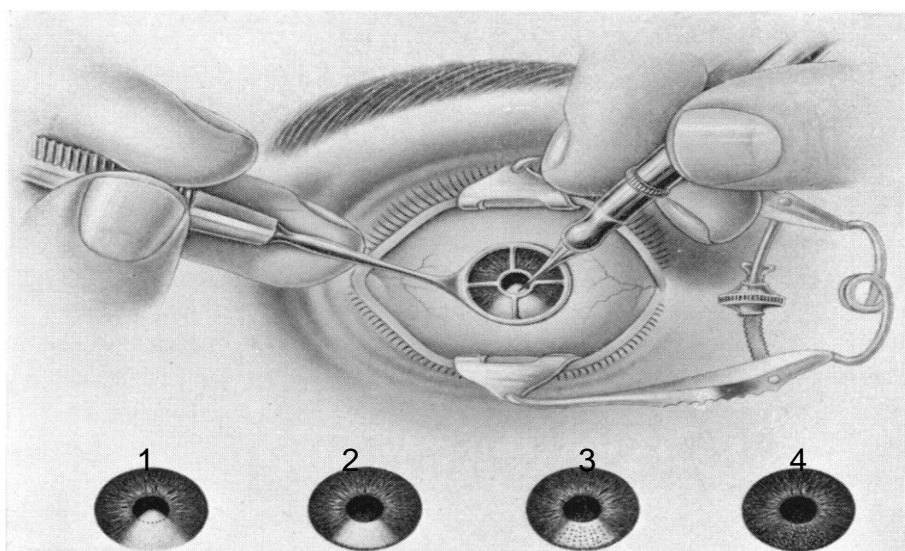


Figura 10: Anillo de fijación de Ziegler y pluma fuente de Nieden. De izquierda a derecha: 10.1. Se delinea el margen de la pupila en negro. 10.2. Círculo de la pupila en negro, pupila terminada. 10.3. Detalles anatómicos del iris en negro. 10.4. Estroma del iris en color (Ziegler 1922).

Si una vez acabado el procedimiento el margen de la pupila parece ser irregular o sobresale un poco de pigmento por encima del mismo, se debería cubrir u oscurecer la parte que sobresale tiñéndola de amarillo Nápoles. En el tatuaje óptico, la aguja única siempre se debería mantener verticalmente, ya que al pinchar oblicuamente se puede levantar el epitelio. Se deberá colocar una compresa de algodón humedecida en el ángulo interior del ojo para absorber las lágrimas o eliminar cualquier pigmento que se pudiera haber desplazado. (Ziegler 1922)

1.5.3. Tercera etapa

Es necesario que el círculo periférico del iris se trate de forma similar con un tono marrón, aunque puede ser indicado utilizar un tono más oscuro del pigmento del iris, ya que se debería imitar al máximo el aspecto del ojo contralateral. (Ziegler 1922)

1.5.4. Cuarta etapa

Los detalles anatomicos del iris (Figura 10.3.) se puntean ligeramente de negro, tras lo cual se extiende el tono correcto de pigmento del iris encima del cuadrante y se tatúa (Figura 10.4.). Se deja secar, se abanica o se le aplica el secador de aire caliente durante uno o dos minutos. Se coloca un vendaje epicorneal transparente de celuloide, vidrio o seda impermeable sobre la superficie tatuada (Figura 11), luego se cierra el ojo y se deja el vendaje durante veinticuatro horas. (Ziegler 1922)

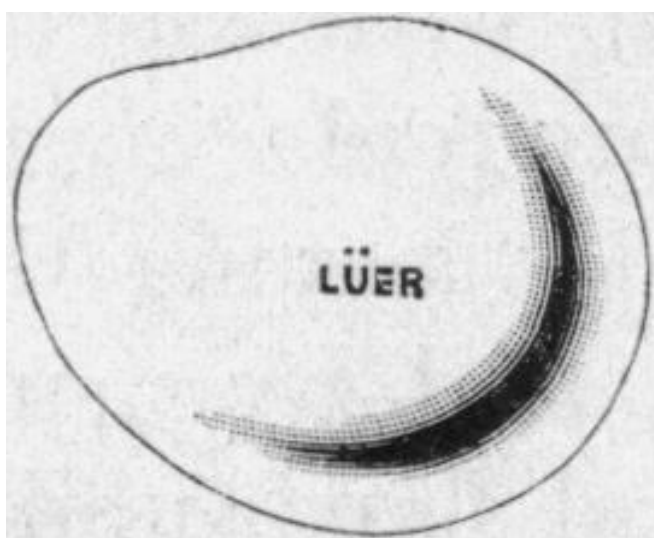


Figura 11: Vendaje epicorneal de celuloide (Ziegler 1922)

Después del tratamiento, se puede instilar Eserina o pilocarpina como describe Tyson ^(Tyson) en los casos en que se manifieste o se sospeche que existe una tendencia glaucomatosa. En caso de dolor o inflamación, se deberán utilizar inmediatamente unas almohadillas de gel helado (*Ice pads*). Si fuese necesario realizar una segunda intervención para completar el tatuaje, se deberá dejar pasar un intervalo de dos semanas.^(Tyson)

1.6. Más historia sobre el tatuaje corneal

Como se ha relatado anteriormente, el tatuaje multicolor es a la vez cosmético, óptico y no induce procesos inflamatorios, por lo que resulta ampliamente satisfactorio tanto para el paciente como para el cirujano. En las figuras 5, 6 y 7 se muestran las agujas de tatuaje que se utilizaban en aquel entonces.^(Ziegler 1922)

Más tarde, en 1925, Knapp et al. utilizaron una solución de cloruro de oro, que se redujo con epinefrina o ácido tánico. No obstante, este método dio lugar a un color marrón dorado y no a un negro azabache.^(Ziegler 1922) En 1928, Krautbauer et al. introdujeron un nuevo método que implicaba impregnar el tejido corneal con negro de platino. Este último proceso se consiguió retirando primero el epitelio, impregnando el tejido corneal con cloruro de platino, y aplicando el hidrato de hidrazina para reducir el cloruro de platino, lo que daba lugar a una precipitación *in situ* del negro de platino, encima del cual crece el epitelio.^(Krautbauer 1928)

Los métodos que se indican arriba se consideran los primeros pasos y los ensayos iniciales de la construcción del arte del tatuaje corneal y son relativamente antiguos. Hablemos ahora de los métodos relativamente más nuevos de dichas técnicas.

1.7. Queratopigmentación en la actualidad

1.7.1. Pigmentos, técnicas, indicaciones y resultados en la actualidad

Como ya se ha descrito anteriormente, se han utilizado varios productos químicos, incluida la tinta china (Tyson), colores metálicos en forma de polvo (Ziegler 1922), varias tinciones orgánicas, pigmentos uveales de ojos de animal (Cofler 1902, Ziegler 1922), una combinación de tinta china (Ziegler 1922) y polvo de oro, (Ziegler 1922) negro humo y hollín, (Ziegler 1922) cinabrio y azul Berlín, (Ziegler 1922) ultramarino y sepia, (Taylor 1872) óxido crómico, óxido de plomo, (Ziegler 1922) índigo, siena, goma guta, (Ziegler 1922) carmín y ocre (Ziegler 1922) y pigmentos japoneses. (Cofler 1902, Ziegler 1922)

De la misma forma, para conseguir diferentes efectos se han utilizado una combinación de productos químicos, (Duke-Elder 1965) como son los productos de oro (tinte negro-marrón) (Ziegler 1922) y los productos a base de platino (tinte de color negro azabache con brillo metálico). (Ziegler 1922) En 1928, Holth (Duke-Elder 1965) sugirió el uso de sales de plata solubles en agua e hidrato de hidracina para crear un efecto de color que se asemeja a un iris de color marrón, el uso del negro de humo y cobalto para imitar un iris azul, y finalmente el uso del siena tostado para simular un tono verdoso. Los pigmentos insolubles y sus mezclas utilizadas para conseguir tales colores en el tatuaje mecánico de la córnea incluyen dióxido de titanio (blanco), óxido de hierro inorgánico (marrón), óxido de hierro (negro), y dióxido de titanio (azul). (Clark 1947, Reed y Beran 1988, Reed 1994)

A lo largo de la historia, el objetivo principal del tatuaje corneal ha sido cosmético. Sin embargo, su uso en ciertos casos hizo posible aumentar el rendimiento óptico del ojo al reducir el deslumbramiento causado por cicatrices corneales y al eliminar la diplopía monocular en pacientes con iridectomía o coloboma congénito del iris. (Ziegler 1922, Reed y Beran 1988, Reed 1994) También ha sido demostrado la restauración de los problemas funcionales creados por los defectos del iris, en un caso de atrofia esencial del iris tratado con queratopigmentación

asistida por femtosegundo, no solo mejorando los síntomas del paciente sino también proporcionando un excelente resultado estético.^(Alió 2011a, Alió 2011b) En las Figuras 12 y 13 se puede observar los resultados estéticos obtenidos con esta técnica. Tres meses después del procedimiento, la agudeza visual mejor corregida fue de 20/20 con corrección de la fotofobia, la diplopia y un excelente resultado cosmético (Figura 13B). Tras 12 meses de seguimiento no se observaron complicaciones.^(Alió 2011a)

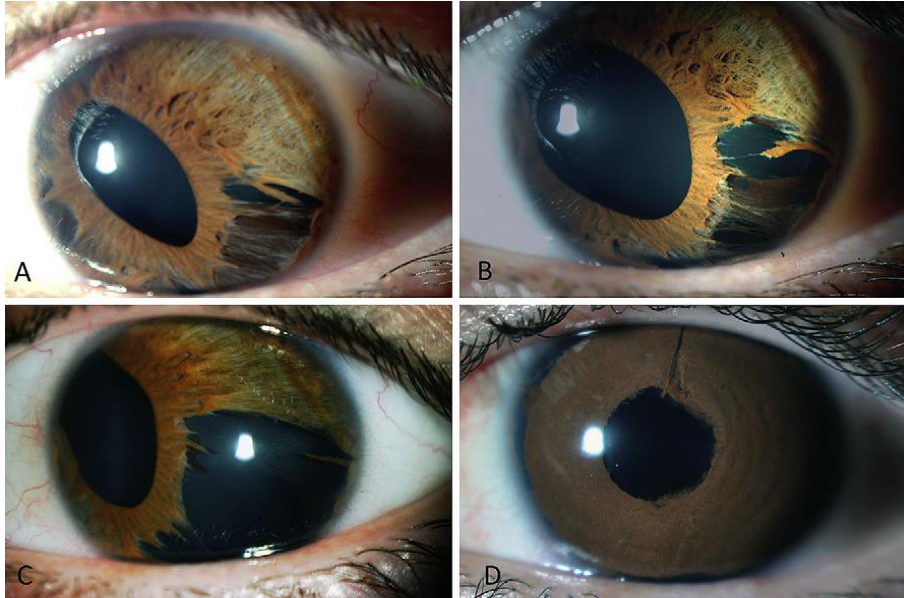


Figura 12: Imagen obtenida con una lámpara de hendidura de una paciente con atrofia esencial del iris. A: Primera visita (pupila ovalada y agujeros atróficos del iris). B: La segunda visita, después de 3 meses (pupila más grande, irregular y con más áreas de atrofia). C: La tercera visita, después de 3 meses (típica policoria y corectopia). D: Postoperatorio tras queratopigmentación asistida por femtosegundo (Alió 2011a)

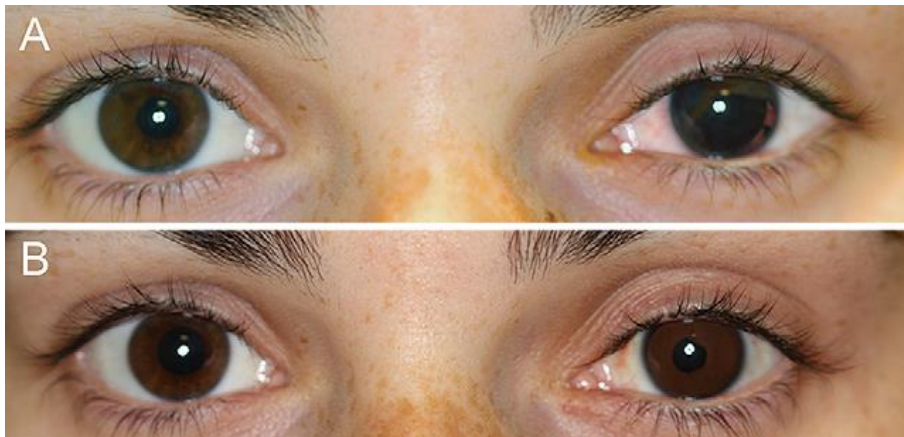


Figura 13: A: Aspecto cosmético binocular antes de la cirugía. B: Aspecto cosmético binocular 3 meses después de la cirugía (Alió 2011a)

Otro caso en el que no solo se consigue un resultado estético si no también funcional es el presentado por Alió ^(Alió 2012) (Figura 14 y Figura 15), tras una queratopigmentación asistida por femtosegundo en un paciente con un síndrome de Urrets-Zavalía (iridoplejía traumática) secundario a un traumatismo contuso en el ojo derecho.

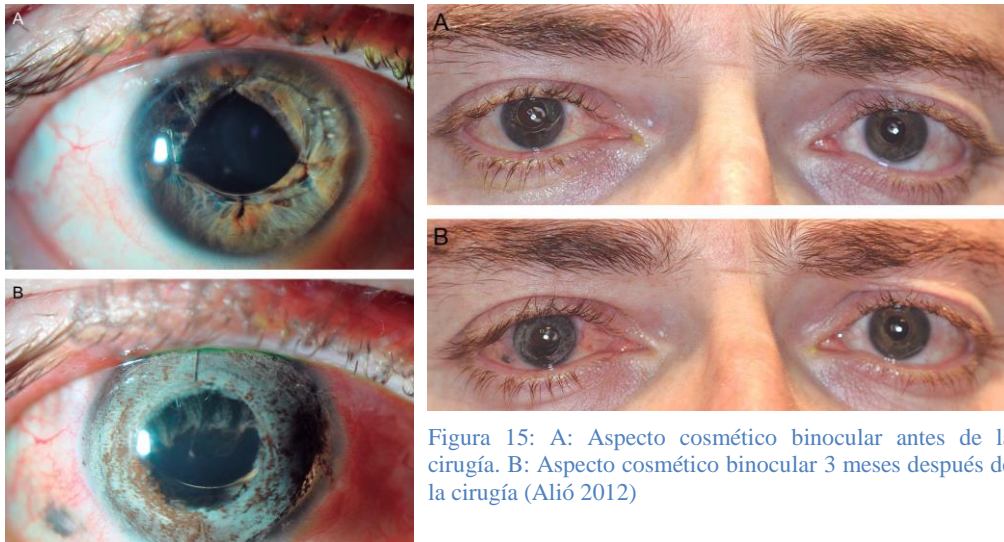


Figura 14: A: Síndrome de Urrrets-Zavalía con pupila fija, dilatada y atrofia del iris. B: imagen postoperatoria con técnica del doble túnel estromal asistido por femtosegundo (Alió 2012)

Figura 15: A: Aspecto cosmético binocular antes de la cirugía. B: Aspecto cosmético binocular 3 meses después de la cirugía (Alió 2012)

1.7.2. Técnicas de queratopigmentación en la actualidad

Se han sugerido diferentes métodos para producir un tatuaje corneal. Esto se consigue ya sea creando la precipitación de un pigmento en el tejido corneal mediante una reacción química con una solución de metales, como cloruro de oro (Ziegler 1922),(Clark 1947), nitrato de plata (Gifford 1927, Pischel 1930, Clark 1947), o cloruro de platino (Ziegler 1922, Pischel 1930, Clark 1947), o alternativamente, utilizando e inyectando directamente (Panda, Mohan et al. 1984, Burris, Holmes-Higgin et al. 1998) un pigmento insoluble como por ejemplo, la tinta china (Ziegler 1922), el óxido de hierro (Ziegler 1922, Van der Velden-Samdeerubun 1994) o el dióxido de titanio (Reed 1994) en el estroma corneal (Muller and van der Velden/Samdeerubun 1988). En muchos casos las técnicas anteriores no resultaron satisfactorias debido a la variable tinción, decoloración e inflamación del segmento anterior.^(Wiegmann 1929)

Recientemente se han descrito abordajes más nuevos para la queratopigmentación utilizando la ventaja anatómica de la estructura lamelar de la córnea, lo que sugiere la posibilidad de que se puede obtener una distribución más precisa, uniforme y reproducible del pigmento.^{(Panda, Mohan et al. 1984, Beekhuis, Drost et al. 1998,}

Burris, Holmes-Higgin et al. 1998, Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)

En los trabajos dirigidos por Alió et al. se ha diseñado una técnica de queratopigmentación intraestromal asistida por femtosegundo, en la cual se crean dos túneles intraestromales, un túnel profundo y otro superficial, cada uno con un objetivo diferente. El túnel profundo tiene una finalidad funcional, que radica en impedir el paso de la luz, mientras que el túnel superficial tiene una finalidad cosmética, para dar un color similar al del ojo contralateral (Figura 16).^(Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)



Figura 16: A: Capa profunda más oscura para absorber la luz. B Capa superficial de color claro, que coincide con el color del ojo contralateral y por lo tanto con fines cosméticos (Alió 2012)

En 1984, Panda et al. ^(Panda, Mohan et al. 1984) describieron una serie de casos de queratopigmentación en los que se comparaba el procedimiento del bolsillo intralamelar con la pigmentación de la superficie. Los procedimientos intralamelares se asociaron con menor inflamación y con una necesidad considerablemente menor de recurrir al procedimiento de "aumento" descrito. Más recientemente, Beekhuis et al. ^(Beekhuis, Drost et al. 1998) describieron la "queratografía estromal lamelar" para el tratamiento de la fotofobia en anidria, en la que se colocaron los pigmentos intraestromales tras la disección lamelar para crear el iris artificial.

Burris et al. ^(Burris, Holmes-Higgin et al. 1998) describieron una técnica de tatuaje intraestromal lamelar en ojos procedentes del banco de ojos, como una posible modalidad de tratamiento para corregir los defectos ópticos y cosméticos que resultan de los defectos simulados del iris.

Unos años más tarde Alió et al.^(Alió 2010) realizan un estudio en el que se comparan cuarenta ojos tratados con la técnica de tinción corneal superficial o con la técnica de tinción corneal intraestromal alternativamente, utilizando para ello pigmentos minerales micronizados, con fines cosméticos, en ojos severamente deteriorados, como alternativa a la cirugía reconstructiva cosmética invasiva. En dicho estudio se concluye que la tinción intraestromal resulta más beneficiosa que la tinción superficial, ya que proporciona un aspecto más homogéneo del área pigmentada, el procedimiento quirúrgico es más rápido, el paciente muestra una recuperación postoperatoria también más rápida y menos sintomática, la superficie de la córnea permanece inalterada y la tinción no está en contacto con la película lagrimal.^(Alió 2010) En la siguiente Figura 17 se muestra un ejemplo de tinción corneal intraestromal realizada por dicho autor.^(Alió 2010)

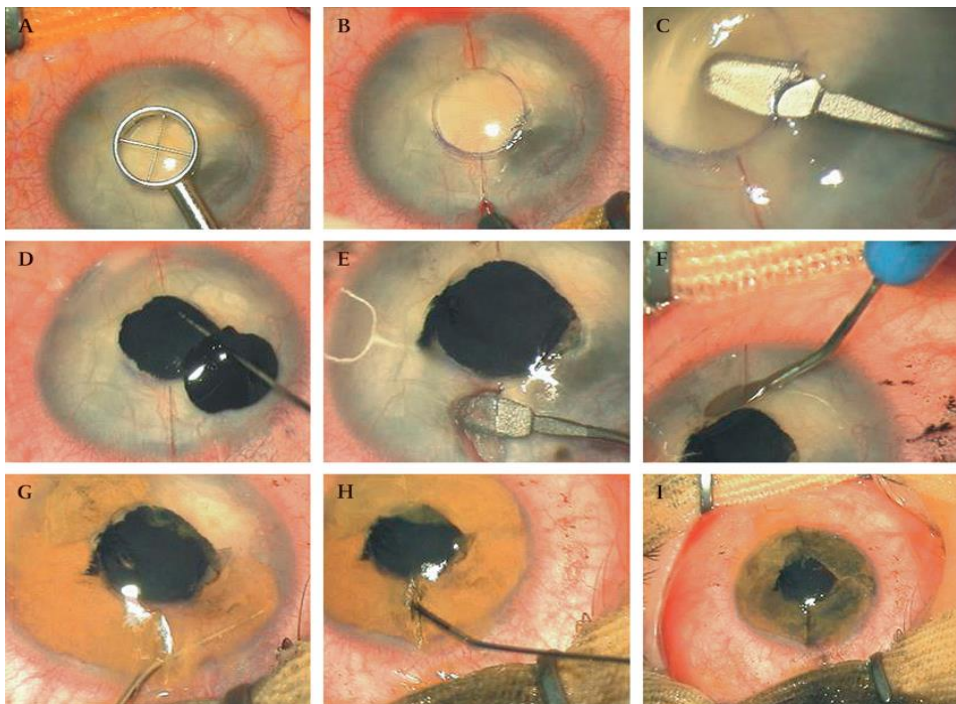


Figura 17: (A) Marcado del diámetro de la pupila de 4 mm estimado previamente. (B) 3 ó 4 incisiones con un cuchillete de diamante de 1 mm previamente calibrado. (C) Disección intraestromal de la córnea con un cuchillete Microcrescent (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, Pennsylvania). (D) Tinción con el color oscuro (0,1 cm³) con una cánula de calibre 30G. (E) Disección de la córnea periférica superior. (F) Disección de la córnea periférica inferior. (G) Coloración de la córnea periférica de forma irregular para recrear mejor las crestas del iris. (H) Mezcla de los colores negro y amarillo-marrón para dar un color similar al del ojo contralateral. (I) Resultado final del tatuaje corneal (Alió 2010).

Se han utilizado diferentes dispositivos para introducir pigmentos en la córnea, incluyendo las agujas de catarata,^(Von Wecker 1870, Ziegler 1922, Van der Velden, de Jong et al. 1993) manojos de agujas finas,^(Taylor 1872) agujas huecas,^(Ziegler 1922) y dispositivos de blefaromicropigmentación (Figura 18).^(Wessels and Wessels 1996)



Figura 18: Dermógrafo utilizado en la micropigmentación

Para un delineado preciso de la córnea circular, se han utilizado diferentes métodos que abarcan desde retirar el exceso de pigmento hasta levantar un colgajo circular, frotando la tinta sobre la superficie del estroma y sustituyendo posteriormente el colgajo; o alternativamente "inyectando tinta en el punto medio de la zona afectada y permitiendo que la tinta se disperse mediante centrifugado dentro de las láminas estromales".^(Rothschild 1918) Como se ha mencionado anteriormente, también se ha utilizado el láser Excimer (Figura 19) como una técnica para extraer el epitelio y crear un margen perfectamente delineado para el tatuaje.^(Anastas, McGhee et al. 1995, Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)

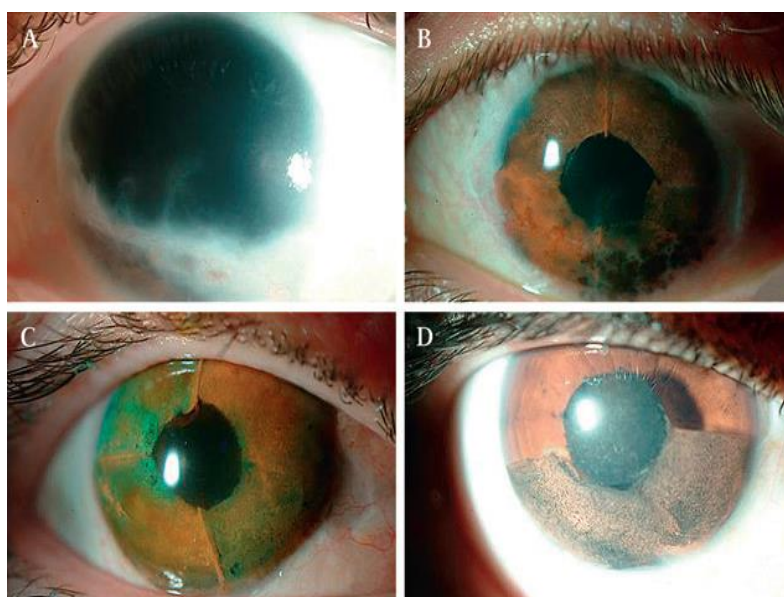


Figura 19: Aspecto Preoperatorio (A) y Postoperatorio (B, C, D) (Alió 2010)

Para resumir, entre las técnicas quirúrgicas utilizadas actualmente en la queratopigmentación se encuentran:

- Queratopigmentación superficial.
- Queratopigmentación intraestromal manual.
- Queratopigmentación intraestromal asistida por femtosegundo.

A diferencia de estos tres métodos empleados en la actualidad, antiguamente se conocían dos métodos de tatuaje corneal completamente diferentes. Un método utilizaba la tinción química con cloruro de oro o de platino, una sencilla técnica que principalmente se utilizaba en Occidente debido al trabajo pionero realizado por Knapp, Kerautbauer, Bietty y otros.^(Duke-Elder 1965) Mientras que el otro método era 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.^(Olander, Kanai et al. 1983) Más tarde se utilizaron la tinta china, el negro de humo, y otros colorantes.^(Olander, Kanai et al. 1983)

1.8. Indicaciones recientes para la pigmentación corneal

Debido al progreso satisfactorio de la queratoplastia penetrante y la posibilidad de adaptación de lentes de contacto en los casos de leucomas corneales, la lista de indicaciones para la pigmentación corneal se ha visto reducida significativamente.^(Sekundo, Seifert et al. 1999) Otro motivo que disminuye el número de indicaciones son los recientes avances realizados en la cirugía reconstructiva de la superficie ocular y el aumento de la popularidad de las lentes de contacto de color. Estas lentes de contacto cosméticas, la enucleación y la evisceración con prótesis orbitaria asociada a prótesis lamelar externa o epítisis, son los métodos que se utilizan con mayor frecuencia para mejorar el aspecto estético en ojos cosméticamente inaceptables y deficientes.^(Hallock 1995, Hoeyberghs 1999, Kuzan 1999) Las prótesis suelen causar inflamación, infección y dolor,^(Ziegler 1922) y por su parte, la queratoplastia penetrante tiene riesgo de infección y de rechazo del injerto, además

de que en muchos casos suele ser imposible de realizar con fines cosméticos debido a la escasez mundial de donantes de tejido corneal, lo que hace que la queratoplastia por motivos cosméticos, sea éticamente inaceptable en muchas partes del mundo. No obstante, en los casos seleccionados de pacientes que presentan cicatriz corneal excéntrica e intolerancia a las lentes de contacto, las quejas de deficiencia visual secundaria a la dispersión de la luz se pueden tratar con técnicas de queratopigmentación. En estos casos se considera una buena y sencilla alternativa o la única posibilidad de mejorar la agudeza visual. (Sekundo, Seifert et al. 1999)

1.9. Resultados de la queratopigmentación

Mannis et al. (Mannis 1999) describieron casos en los que se realizó la queratopigmentación en dos grupos de pacientes. En el primer grupo, ésta se realizó debido a que los pacientes se quejaban de padecer un deslumbramiento incapacitante y diplopía monocular a causa de un coloboma de iris con extensión al margen pupilar o atrofia esencial de iris. En el segundo grupo, se realizó debido a que los pacientes estaban descontentos con el aspecto cosmético de sus ojos y no aceptaban probar la tolerancia de una lente de contacto con iris pigmentado. Los resultados fueron satisfactorios. En el primer grupo, todos los pacientes manifestaron que sus síntomas habían desaparecido completamente; y en cuanto a las quejas del otro grupo, los pacientes quedaron satisfechos con el aspecto cosmético. (Mannis 1999)

1.9.1. Resultados histológicos

Por otro lado, Sekundo y colaboradores realizaron exámenes histológicos en dos córneas humanas tatuadas, y en ambos casos encontraron gránulos de pigmentos no metálicos en los queratocitos, al contrario de lo que ocurrió en los pacientes con tatuajes con pigmentos metálicos. (Sekundo, Seifert et al. 1999) Llegaron a la conclusión de que los queratocitos pueden ingerir activamente y retener partículas

de colorantes no metálicos en sus membranas celulares durante un período de tiempo muy largo (Figuras 20 y 21).

En la Figura 20 se puede observar que las concentraciones más altas de partículas de pigmento se observan en las capas estromales medias (hematoxilina y eosina, 40 aumentos respecto al original).^(Sekundo, Seifert et al. 1999)

En la Figura 21 se puede observar un queratocito subepitelial con aglomeraciones de partículas de pigmento. La matriz extracelular adyacente no presenta material extraño (MET, barra de aumento = 1 μm).^(Sekundo, Seifert et al. 1999)



Figura 20

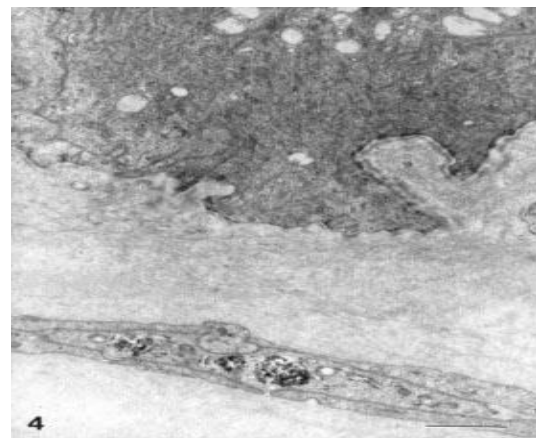


Figura 21

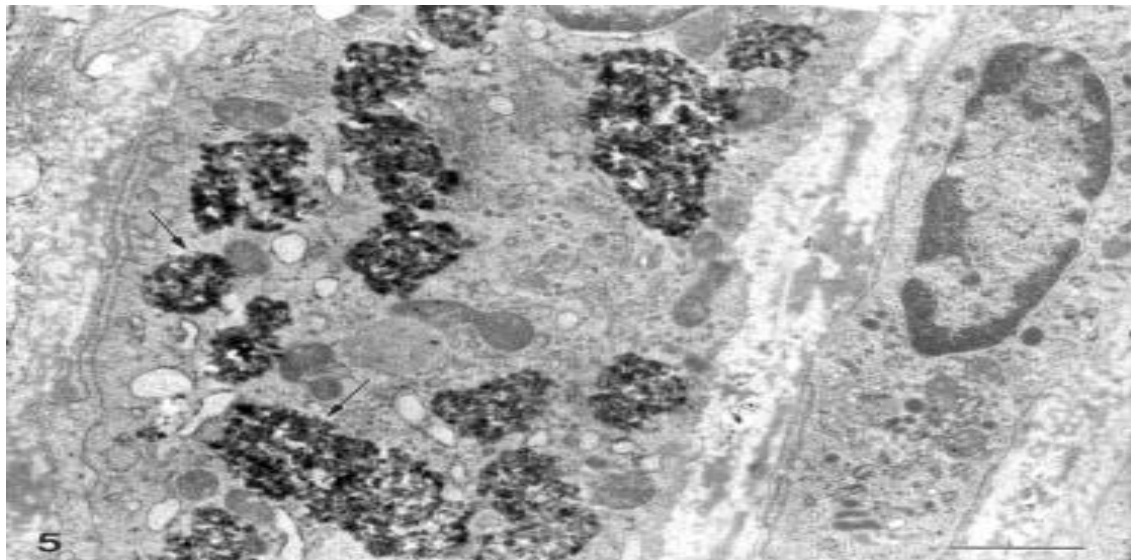


Figura 22

Fujita y colaboradores demostraron experimentalmente que los fibroblastos de la córnea de conejo pueden ingerir mediante endocitosis partículas de tinta china inyectada en un plazo de 3-4 días y conservarlas durante al menos 6 meses.^{(Fujita,}

Ueda et al. 1987) Takahashi y colaboradores también examinaron botones corneales procedentes de 3 pacientes japoneses a quienes se les había realizado queratopigmentación 12, 20 y 34 años antes. (Takahashi 1990) Según describieron, estos pacientes presentaban partículas de tinta India tanto intracelular como extracelularmente.

Considerados en conjunto, estos informes sugirieron que la tinta china que anteriormente se había utilizado en Japón puede contener algunos ingredientes diferentes a los utilizados en países de occidente.

Por lo que entendemos que en un estudio ultraestructural realizado para comparar el tatuaje metálico (Olander, Kanai et al. 1983) con el tatuaje no metálico (Sekundo, Seifert et al. 1999) se encontraron gránulos dentro de los queratocitos en el tatuaje no metálico, mientras que se encontraron gránulos intracelulares y extracelulares tras el tatuaje con cloruro de platino.

La ausencia de partículas extracelulares en el tatuaje no metálico sugiere que la endocitosis de sustancias orgánicas por parte de fibroblastos de córnea humana es más permanente y estable que la endocitosis de material metálico en el que se detecta fácilmente ubicación extracelular (Figura 23). Por tanto, existen algunas

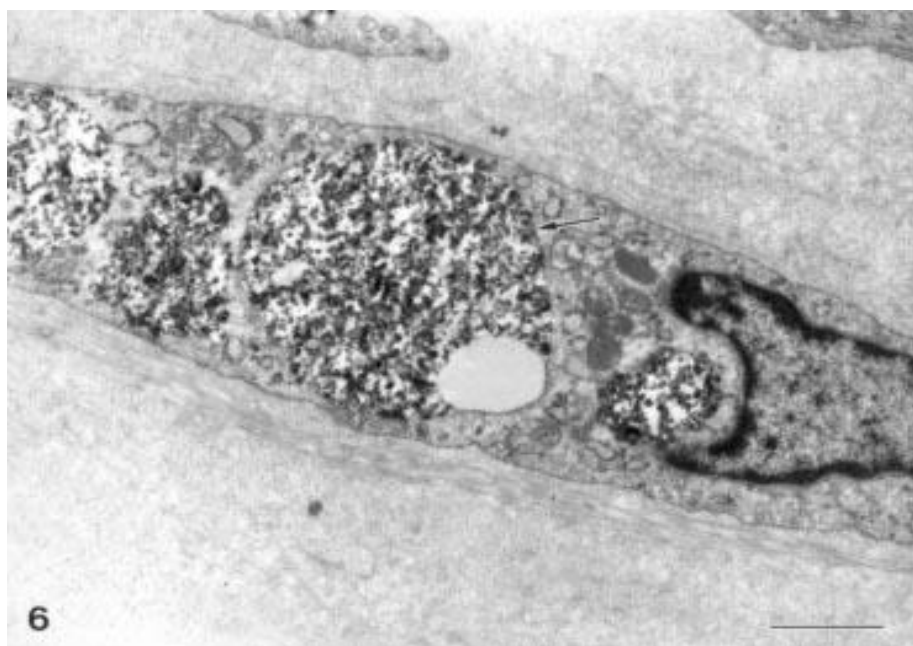


Figura 23

diferencias entre las especies humanas y otras especies en lo que respecta a la ubicación intracelular o extracelular de las partículas tatuadas en relación con su naturaleza química, ya sea metálica o no metálica. En la Figura 23 se observa un queratocito del estroma medio con gránulos de tatuaje de diferente densidad electrónica. Las aglomeraciones individuales están rodeadas de una membrana unitaria (flecha) (MET, barra de aumento = 1 μm). (Sekundo, Seifert et al. 1999)

Asimismo, Fujita et al. (Fujita, Ueda et al. 1987) sugieren que la fagocitosis por parte de los fibroblastos de la córnea es la reacción que protege la córnea de las lesiones y daños debidos a materiales extraños no tóxicos. Suponiendo que las sales metálicas a nivel celular son más tóxicas que las sustancias orgánicas, sería de esperar que se encontrara una cantidad más alta de restos celulares en la matriz extracelular de la córnea. Esto puede inducir una inflamación de bajo grado en el estroma corneal con ablandamiento y melting posterior de la misma. (Lea and Pawlowski 1987)

1.9.2. Complicaciones de la queratopigmentación



Figura 24: Tras siete días del tatuaje con cloruro de platino.

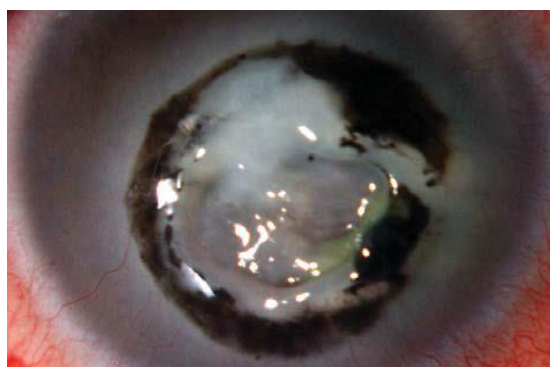


Figura 25: Ablandamiento del estroma corneal después de seis semanas del tatuaje corneal

Como ejemplo de complicaciones conocidas de la queratopigmentación, recientemente se presentó un caso de ablandamiento del estroma corneal tras la aplicación de cloruro de platino en un tatuaje corneal. Hasta donde sabemos, fue el primer informe de dicha complicación en esta modalidad de tratamiento; al paciente se le realizó un tatuaje corneal utilizando la reducción química de cloruro de platino.

La técnica consistía en retirar el epitelio corneal por encima de la zona opacificada y aplicar un trozo de papel secante del mismo tamaño, humedecido en una solución recién preparada de cloruro de platino al 2% durante 2 minutos para impregnar los tejidos subyacentes. Tras retirar el papel secante, se aplicaron unas gotas de solución recién preparada de hidrato de hidrazina al 2% durante 25-30 segundos para reducir el cloruro de platino. Esto provocó la precipitación del negro de platino *in situ*, lo que hizo que la zona adquiriera un aspecto de color negro. Se irrigó el ojo con suero salino y se colocó una lente de contacto. Tras la operación, al paciente se le trató con Colirio de Dexametasona 1mg/ml, Neomicina 3500 UI/ml y Polimixina B 6000UI/ml (Maxitrol®, Alcon) cuatro veces al día durante una semana; y ciclopentolato 1% (Ciclopléjico®, Alcon) dos veces al día durante una semana. En 7 días se produjo un crecimiento del epitelio por encima del depósito negro del negro de platino (Figura 24). Seis semanas más tarde, el paciente acudió para el seguimiento de rutina y no presentaba ninguna complicación ocular importante. En el examen biomicroscópico del ojo tatuado se observó que la conjuntiva estaba levemente hiperémica, que presentaba un ablandamiento del estroma corneal de aproximadamente un 70% del grosor del estroma corneal, con un defecto del epitelio corneal y sin visualización de la cámara anterior (Figura 24 y Figura 25). Se hizo un seguimiento del paciente y se le trató hasta que se curó el defecto epitelial, lo cual se produjo lentamente durante un largo período de tiempo.^(Lea and Pawlowski 1987)

La posible explicación para la reepitelialización inicial y la posterior erosión se puede deber a dos motivos. Primero: la escasa adherencia del epitelio a las zonas en las que se aplica el material de tatuaje. Segundo: la interferencia con la migración de nutrientes acuosos al epitelio corneal debido a una función de barrera con muerte celular y descamación. La pérdida de epitelio se puede asociar con un aumento de los niveles de metaloproteinasas de la matriz debido a la activación de la producción de colagenasa por parte de los queratocitos, así como la liberación por células inflamatorias recientemente reclutadas,^{(Macartney and Tschesche 1983, Fini, Cui et al. 1991, Fini, Girard et al.}

1992) con ablandamiento estromal posterior. No obstante, se pueden considerar otras causas posibles como, por ejemplo, la reactivación de una queratitis estromal herpética de grado bajo o la aparición de infección fúngica.^(Lea and Pawlowski 1987) A partir de este caso o de las complicaciones descritas no quedan claros los resultados finales de estas complicaciones, aunque se podría considerar una desventaja de la vieja técnica de queratopigmentación en la que se retira el epitelio y se impregna el estroma de pigmento.

1.10. Queratopigmentación, su anticipación en ojos funcionales

Para ello describimos un caso, en el cual el tatuaje de la zona con cicatrices pudo reducir el deslumbramiento y aumentar la agudeza visual debido a que una cicatriz semitranslúcida se convierte en una placa total que causa un escotoma absoluto.^(Sekundo, Seifert et al. 1999) De esta forma, las dobles pupilas se convierten así en una única apertura pupilar que causa que una única luz difusa entre en el ojo y proporcione un buen contraste sin ningún efecto de deslumbramiento (Figura 26 y Figura 27).

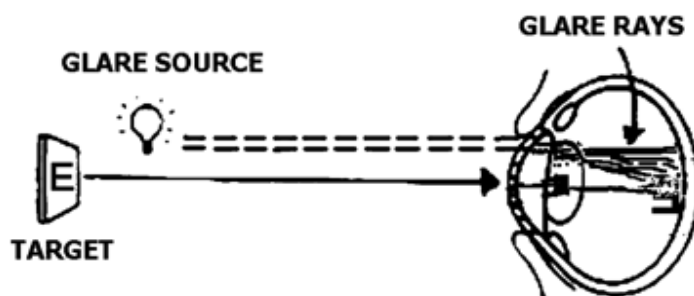


Figura 26

No obstante, el resto de los problemas del tatuaje corneal continúan siendo su inestabilidad a largo plazo y una configuración geométrica imperfecta.^{(Sekundo, Seifert et al.}

1999)

Una nueva modificación del procedimiento de tatuaje, que puede eliminar el problema de la tinción irregular, fue recientemente publicada por Anastas et al. (Anastas, McGhee et al. 1995) y Alió et al. (Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012) quienes utilizando un láser excimer consiguen preparar un lecho corneal ideal circular y liso para el tatuaje reduciendo las irregularidades del tatuaje. 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 (Sekundo 1996). Por consiguiente, la combinación de una nueva tecnología y de la antigua técnica puede aumentar la popularidad del procedimiento de tatuaje en el futuro. No obstante, la resistencia a la decoloración a largo plazo continúa siendo otro problema importante sin resolver.



Figura 27: Iridodiálisis: La iridotomía periférica permite crear un efecto de reducción del contraste mediante luz difusa sobre la superficie retiniana para oscurecer la imagen macular 'E' (Islam)

1.11. Tatuaje metálico y no metálico, estudio ultraestructural

Aunque se ha descrito que el tatuaje químico metálico no es tan estable como el método de impregnación no metálico, tiene algunas ventajas muy importantes: la técnica es rápida, sencilla, y proporciona un mejor color negro azabache. (Duke-Elder 1965, Olander, Kanai et al. 1983) Este es el motivo por el cual el método químico continúa siendo el método que actualmente se utiliza con mayor frecuencia en los países occidentales. (Anastas, McGhee et al. 1995) Por tanto, el principal hallazgo del estudio publicado por Sekundo et al. es el hecho de que en todos los casos se observaron

todos los gránulos en los queratocitos, al contrario de lo que sucede en el tatuaje metálico. En un estudio ultraestructural del tatuaje metálico de la córnea, Olander et al. demostraron la existencia de gránulos intracelulares y extracelulares 10 años después del tatuaje con cloruro de platino.^(Olander, Kanai et al. 1983)

En varios estudios ultraestructurales de tatuajes de piel se ha observado que no sólo los macrófagos, sino también los fibroblastos, son capaces de endocitosis. Los tatuajes de piel tradicionalmente se basan en colorantes no metálicos.^(Christensen and Schmidt 1972, Lea and Pawlowski 1987, Fujita, Nishii et al. 1988) De hecho, el patrón y el color de los tatuajes de piel permanecen macroscópicamente inalterados durante toda la vida del portador.^(Lea and Pawlowski 1987) 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.^(Lea and Pawlowski 1987) 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.^(Olander, Kanai et al. 1983)

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.^(Sekundo, Seifert et al. 1999) En cambio, Olander et al. observaron gránulos negros redondos con bordes parcialmente indiferentes.^(Olander, Kanai et al. 1983) La ausencia de partículas de tatuajes extracelulares en los casos de Sekundo et al. sugiere que la endocitosis de sustancias orgánicas por los fibroblastos de córnea humana es más permanente y estable que la endocitosis de materiales metálicos,^(Ziegler 1922) en la que la ubicación extracelular se detectaba fácilmente.^(Olander, Kanai et al. 1983) Esta estabilidad fue particularmente evidente en los casos en los que gránulos del tatuaje que contienen queratocitos se observaron en el espacio entre la capa de Bowman y el epitelio, en forma de invasión fibrocelular subepitelial.^(Ziegler 1922)

Aunque en el artículo de Sekundo et al. no está claro si estas células han migrado desde el estroma como resultado de una queratopatía bullosa de larga evolución o desde el limbo como consecuencia de una enfermedad corneal previa, el hecho interesante es que los queratocitos pueden retener partículas incorporadas por endocitosis mientras migran dentro del tejido.

Experimentalmente, este problema fue tratado por Fujita et al., quienes demostraron que los fibroblastos corneales en los conejos pueden incorporar mediante endocitosis partículas inyectadas de tinta India en un plazo de 3–4 días y mantenerlas durante al menos 6 meses.^(Fujita, Ueda et al. 1987) 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). Para explicar este fenómeno, 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.^(Fujita, Ueda et al. 1987)

Suponiendo que las sales metálicas 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 MET es más alta en tatuajes metálicos que en tatuajes no metálicos.^(Sekundo, Seifert et al. 1999)

En resumen, a nivel ultraestructural, el tatuaje no metálico de la córnea difiere del colorante metálico en más de un aspecto variable de las partículas del tatuaje y por una ubicación exclusivamente intracelular, incluso después de muchas décadas. Los queratocitos pueden limpiar y controlar la matriz extracelular mediante la ingestión y retención de material orgánico durante un largo período de tiempo.^(Sekundo, Seifert et al. 1999)

1.12. El color de los ojos

El color de los ojos parece jugar un papel importante en el aspecto físico de muchos hombres y mujeres, tener los ojos negros, olivas o hasta amarillos puede ser algo que llame la atención y ser el centro de atracción, por lo que muchas personas han pensado más de una vez cambiar el color de sus ojos. El color de ojos es un rasgo genético que está determinado por la cantidad y la distribución de melanina en el iris.^(Eiberg 2008) Es un proceso complejo en el que intervienen varios genes que influyen en el resultado final. De igual forma son tres los elementos del iris que contribuyen a darle su color: la melanina del epitelio pigmentario del iris, la melanina de la parte anterior del iris y la densidad del estroma del iris.^(Southworth) Además de la melanina otro pigmento que interviene en el proceso es el lipocromo.^(Bickford) Asimismo, los dos tipos de melanina que participan en el proceso son la eumelanina, de aspecto marrón oscuro, y la feomelanina, de aspecto pardo amarillento-rojizo.^(Montoliu) En todos los colores de ojos, a excepción de condiciones anómalas, el pigmento del epitelio del iris es siempre la eumelanina,^(Prota, Hu et al. 1998) presentándose en gran cantidad.^(Southworth) De esta forma, la variación del color de ojos se produce en principio por el pigmento de la parte anterior del iris y de cuanto luz absorbe el estroma de acuerdo a su densidad.^(Southworth)

1.12.1. Determinantes antropológicas

En el mundo existe una relativa uniformidad en el color de ojos, siendo común el castaño.^(Eiberg and Mohr 1996) Sin embargo la excepción es Europa, donde se generó una diversidad de colores: avellana, verde, azul y gris. En un principio se pensó que tal particularidad era un efecto secundario de la selección natural, asociado a la piel más clara, para asegurar la suficiente vitamina D en las latitudes considerablemente alejadas del ecuador terrestre. Sin embargo, la pigmentación de la piel es afectada solo ligeramente por los genes para el color de ojos, no habiendo relación en muchos casos.^(Frost) También se señaló como causa una hibridación con los

neandertales. No obstante, el genoma mitocondrial recuperado de estos últimos muestra una discontinuidad genética en comparación a los europeos modernos, de tal forma que si afirmamos que hubo algún flujo de genes entre ambos, este no fue proporcionado, considerando el porcentaje de europeos con los ojos claros.^(Frost) Finalmente, algunos genetistas, como Luigi Cavalli-Sforza, afirman que la respuesta se encuentra en la selección sexual. Cuando un sexo supera en número al otro, los individuos del primer grupo deben competir por una pareja, recurriendo a estrategias para captar la atención, tales como el uso de colores brillantes o llamativos.^(Frost)

1.12.2. Determinantes genéticas

El color de ojos (Figura 28) es un carácter hereditario influido por varios genes. Así, en los seres humanos, se conocen varios genes asociados a este:



Figura 28: Colores de los ojos

El gen EYCL1 es responsable de la determinación de los colores verde y azul – alelo dominante y recesivo respectivamente–. Está localizado en el cromosoma 19 ^(Morris). El EYCL2 es el principal responsable del color marrón, y se encuentra probablemente en el cromosoma 15 ^(Morris). El EYCL3: se encuentra entre los genes que regulan la cantidad de melanina del organismo animal. Es así como en seres humanos estos están estrechamente relacionados con los genes responsables de la pigmentación de piel y pelos, y que en conjunto corresponden a los mismos que

mutados o alterados causan los distintos tipos de albinismos oculocutáneos, denominados OCA1-4, y que se encuentran ubicados en el cromosoma 15.^(Montoliu, Eiberg 2008) De estos, el gen P, ubicado en (15q11-12) y responsable asimismo del albinismo oculocutáneo de tipo 2 o también denominado OCA2; es uno de los responsables del color de ojos, principalmente de las tonalidades marrón y azul – alelo dominante y recesivo respectivamente.^(Morris) Otros genes implicados son el SLC24A4, ubicado en (14q32.12); y el TYR, ubicado en (11q14-q21).

Sin embargo, los verdaderos responsables de la variación del color de ojos se hallan en polimorfismos de nucleótidos simples o SNP dentro de estos genes. No se sabe con exactitud el número de SNP que contribuyen a esta variación, pero se han detectado probables candidatos. Asimismo, mediante análisis se han obtenido resultados acerca de los posibles SNP que poseen mayor implicación en el efecto. Un estudio realizado en la Universidad de Copenhague, descubrió que un solo SNP, localizado en HERC2, que regula la expresión del gen para OCA2; es el responsable de la tonalidad azul de los ojos en un 74% ^(Eiberg 2008). Otro estudio, realizado en la Universidad Erasmo de Róterdam en 2009 descubrió que de un total de 37 SNP provenientes de 8 genes que tienen relación con el color de ojos era posible predecir con solo 6 SNP provenientes de 6 genes el tono marrón en un 93%, el azul en un 91% y para los tonos intermedios en un 73% ^(Fan). Sin embargo e incluso así, colores como el gris y el ámbar aún no tienen explicación desde el punto de vista genético.^(Morris)

1.13. Técnicas utilizadas para el cambio de coloración de los ojos

A muchas personas les gustaría cambiar el color de ojos así como se cambia, por ejemplo, el color del cabello. Existen métodos reversibles y no invasivos como el uso de lentes de contacto, las cuales pueden cambiar el color de los ojos de forma pasajera. Igualmente otras sustancias y procedimientos invasivos pueden cambiar el color de los ojos de forma irreversible pero no están exentas de complicaciones, por

lo cual su utilización en casos cosméticos puede ser controvertido.

1.13.1. Procedimientos cosméticos no invasivos



Figura 29: Lentes de contacto de colores

Las lentes de contacto de colores (Figura 29) proporcionan cambios de color naturales a los ojos oscuros. Suelen ser desechables y actualmente están disponibles en una variedad de colores como el Azul, el Azul Zafiro, el Verde, el color Avellana, el Violeta y el Gris, entre otros. Existen muchísimas

marcas y propuestas en función de la demanda y de los problemas relacionados con la visión susceptibles de poder ser resueltos como pequeños traumas o inseguridades. Se trata de lentes blandas, neutras, cosméticas, con aro de definición, y con/sin graduación, que se adaptan fácilmente al ojo.

Según Singh et al. el uso exagerado de lentes de contacto cosméticas ha aumentado con el paso de los años. La fácil disponibilidad y la venta sin supervisión médica de estas lentes cosméticas es seguida por el aumento de las complicaciones graves que amenazan la visión en individuos jóvenes emétopes.^(Singh 2012)

1.13.2. Procedimientos cosméticos invasivos

Recientemente se ha desarrollado una técnica que utiliza un láser fotodisruptivo diseñado por Homer, que elimina de forma irreversible la capa de pigmento superficial del iris. Dicho láser utiliza dos frecuencias que son absorbidas completamente por el pigmento oscuro del iris.^(Ansa 2011) Sin embargo, este tratamiento puede producir dispersión del pigmento iridiano intracamerular, pudiendo ocasionar problemas como glaucoma secundario.

Otro método utilizado son los Implantes cosméticos de Iris o también llamados Iris artificiales (Figura 30). Es ampliamente conocido el gran número de complicaciones secundarias a dichos implantes iridianos, tales como uveítis, glaucoma y descompensaciones corneales,^(Hoguet, Ritterband et al. 2012, Veldman, Behlau et al. 2012) así como también disminución en la agudeza visual.^(Hoguet, 2012) Las indicaciones de estos implantes son principalmente, la aniridia total o parcial, congénita o adquirida por traumatismos, enfermedades oculares o defectos adquiridos.



Figura 30: Iris artificial (Schmidt 2010)

El objetivo de los implantes no es solo dar el color a los ojos y mejorar los problemas cosméticos, si no también mejorar la agudeza visual al mejorar la fotofobia, las aberraciones, el glare y la mejoría de la profundidad de foco.^{(Schmidt 2010,}

Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)

1.14. Últimos estudios en queratopigmentación con fines cosméticos

En un estudio reciente se consiguió la estabilidad a largo plazo ^(Sirerol 2011) y resultados cosméticos satisfactorios con las técnicas de queratopigmentación. La técnica se puede utilizar para el tratamiento cosmético de pacientes con cicatrices corneales desfigurantes, así como terapéuticamente para el tratamiento de aniridia incapacitante.^(Sirerol 2011, Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012) Según los autores, la calidad de vida de dichos pacientes se puede mejorar considerablemente mediante esta sencilla y

eficaz técnica ^(Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012, Rey 2013). Algunas de las conclusiones en dichos estudios son las siguientes: el procedimiento quirúrgico se puede realizar en ojos con función visual normal, es útil para el tratamiento del deslumbramiento y de la fotofobia asociada con leucomas y aniridias, en algunos casos se puede conseguir la rehabilitación visual y una mejor visión. ^(Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012, Rey 2013)

En este mismo estudio se concluyó que la queratopigmentación con pigmentos micronizados minerales utilizando la técnica de tinción corneal intralamelar se consiguió una estabilidad a más largo plazo de los pigmentos y resultados satisfactorios, en comparación con la técnica de tinción corneal superficial. ^(Alió 2010, Rey 2013) Según el autor, las ventajas de utilizar la técnica de tinción corneal intralamelar se enumeran a continuación: el procedimiento es más rápido, proporciona una pigmentación más homogénea, postoperatoriamente proporciona un mayor confort para el ojo tratado, el líquido lagrimal no tiene ningún efecto en el colorante utilizado, lo que da lugar a una mayor estabilidad del pigmento a largo plazo. ^(Alió 2010, Rey 2013) Asimismo, los pigmentos micronizados minerales se pueden utilizar sin riesgo, sin que se produzcan reacciones tóxicas adversas en las córneas tratadas, ya que 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. ^(Alió 2010, Rey 2013, Sirerol 2011)

1.14.1. Pigmentos minerales micronizados

Los pigmentos minerales micronizados presentan una ventaja adicional sobre otros pigmentos naturales, porque el tamaño de su partícula se reduce mediante procedimientos de micronización. Las partículas tan pequeñas disminuyen las probabilidades de desarrollar una reacción a cuerpo extraño contra el pigmento introducido en el estroma corneal. ^(Sirerol 2011, Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)

Otra ventaja importante de los pigmentos micronizados minerales es la amplia

gama de colores disponibles. Esto es muy conveniente en queratopigmentación porque el objetivo principal es imitar con precisión el color del ojo del paciente para obtener el mejor resultado estético posible. La mezcla de diferentes pigmentos para conseguir el color deseado puede hacer de la queratopigmentación un procedimiento muy laborioso y que requiere mucho tiempo. Sin embargo, los pigmentos minerales micronizadas pueden ser previamente mezclados y preparados en viales, esterilizados adecuadamente para ser usados en la cirugía.^(Sirerol 2011, Alió 2011a, Alió 2011b, Alió 2012)

1.14.2. Tolerancia y biocompatibilidad de los pigmentos minerales micronizados

Sirerol ^{Sirerol 2011} presenta los resultados del primer estudio experimental in vivo que determina la tolerancia y la toxicidad del pigmento negro mineral micronizado obtenido del óxido de hierro para el tatuaje corneal, utilizando gallinas marrones Leghorn como modelo experimental. En este experimento no se encontraron signos de toxicidad en las córneas tratadas, lo que sugiere que este tipo de pigmentos son una alternativa válida para su uso en queratopigmentación cosmética. En la Figura

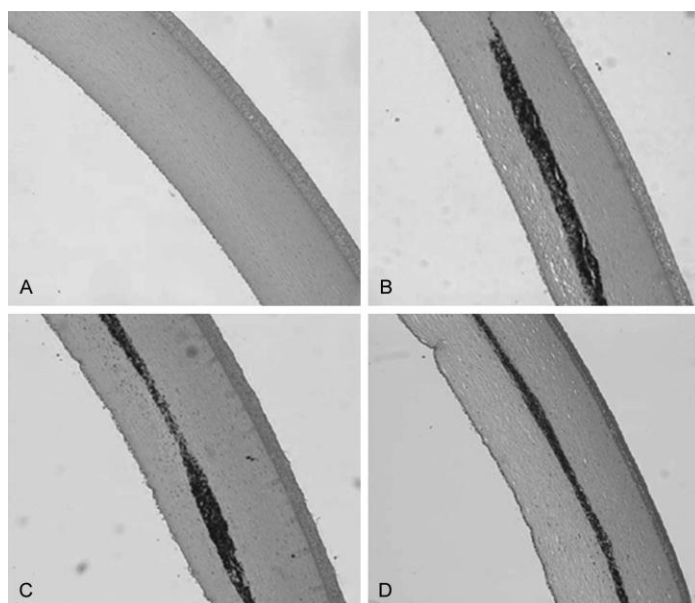


Figura 31. Resultados histopatológicos. A: Control, B: Pigmentación de la central sin signos de inflamación o neovascularización tras 1 mes, C: Uno de los casos con mínima inflamación, D: Ausencia de células inflamatorias o neovasos 3 meses después de la cirugía (Sirerol 2011).

31 se ilustran los resultados histopatológicos de este estudio.

1.14.3. Uso cosmético de los pigmentos minerales micronizados

El tatuaje corneal tatuaje es una técnica antigua que todavía se utiliza como una alternativa a la enucleación y a la evisceración de los pacientes con ojos ciegos quienes muestran intolerancia a las lentes de contacto de color.

En un estudio publicado por Alió et al. (Alió 2010) se estudia la queratopigmentación con pigmentos micronizados minerales, como procedimiento alternativo a la cirugía reconstructiva invasiva, para la corrección estética de ojos con discapacidad. Dicho estudio con fines cosméticos se llevó a cabo en cuarenta ojos humanos. Un año después de la cirugía, todos menos dos pacientes (95%) se mostraron satisfechos. Los ojos pigmentados mejoraron notablemente la apariencia estética del paciente. Sin embargo, ocho casos necesitaron una segunda queratopigmentación. Tres ojos con aniridia traumática obtuvieron no solo un excelente resultado estético, sino también una significativa reducción del deslumbramiento (Alió 2010).



Figura 31: Apariencia pre y postoperatoria. 2A: Aspecto preoperatorio del ojo izquierdo, 2B: Resultado al año. 3A: Aspecto preoperatorio antes de la reconstrucción del segmento anterior que incluye una lente intraocular suturada a sulcus, 3B: Pigmentación sólo con pigmento azul, 3C: Segunda pigmentación de ajuste. 4A: Aspecto preoperatorio de un paciente con atrofia parcial del iris secundaria a trauma ocular, 4B: 1 año después de una simulación del iris sectorial. 5A: Aspecto preoperatorio de paciente con leucoma corneal y estrabismo, 5B: Resultados 1 año después de la cirugía del estrabismo, reconstrucción parcial del iris y la simulación del color con queratopigmentación (Alió 2010).

Por lo anteriormente expuesto y lo recientemente publicado en la materia, desde un punto de vista cosmético, la queratopigmentación consigue buenos resultados y una alta tasa de satisfacción por parte de los pacientes, ya que les evita las extensas, complicadas y mutilantes cirugía reconstructivas.

2. JUSTIFICACION

El color de los ojos juega un papel importante en el aspecto físico de hombres y mujeres. El tener los ojos de un determinado color se considera un rasgo importante en el fenotipo de un individuo. La sociedad moderna cada vez más demanda técnicas quirúrgicas que modifiquen algún rasgo estético de su cuerpo y la oculoplástica en la actualidad debe intentar seguir líneas de investigación que en un futuro satisfagan las necesidades de una población cada día más demandante en lo que al aspecto cosmético se refiere.

Las técnicas de queratopigmentación son técnicas de uso antiguo y para su realización se han empleado pigmentos de distinta índole. Hoy día estas técnicas de pigmentación debidamente manejadas, pueden ofrecer una alternativa real no solo a ojos con defectos cosméticos importantes (en los cuales la única alternativa sería la cirugía reconstructiva del globo ocular, la enucleación o la evisceración) sino también pueden ofrecer buenos resultados cuando la finalidad cosmética es la primordial. Para ello es imprescindible demostrar la seguridad y tolerancia corneal de estas técnicas y pigmentos a través de modelos experimentales.

Recientemente se ha concluido que los pigmentos micronizados minerales se pueden utilizar en la pigmentación de córneas, ya que se ha demostrado que no ocasionan reacciones tóxicas adversas en los ojos tratados y que tienden a permanecer en el espacio intraestromal en el que se inyectan, sin difundir a los tejidos circundantes.

La presente tesis doctoral, pretende determinar la utilidad de una serie de pigmentos micronizados minerales para su empleo en las técnicas de queratopigmentación con fines cosméticos.

También se pretende comprobar la eficacia, la permanencia y la estabilidad de dichos pigmentos, así como la asociación de reacciones inflamatorias para evaluar la viabilidad de la queratopigmentación tanto en ojos sanos como enfermos.

Para ello se creará un modelo experimental que permita obtener un abanico de colores para imitar de forma real el color natural del iris, y de esta forma estos colores puedan ser empleados en la queratopigmentación tanto con fines cosméticos como terapéuticos.

3. HIPOTESIS

La presente tesis doctoral se ha elaborado en base a la confirmacion de las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Los pigmentos micronizados minerales son ideales para conseguir buenos resultados tanto en la queratopigmentación con motivos cosméticos en ojos sanos como en 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 histopatológica.

3. Comprobación de los pigmentos en un modelo experimental animal: Todos los colores de pigmentos son tolerados por la córnea experimental sin inducir reacciones inflamatorias o cicatriciales asociadas a su uso.

4. La técnica de queratopigmentación intraestromal resulta una forma eficaz y segura que permite inyectar el pigmento en un túnel intraestromal, evitando su contacto con la superficie ocular, disminuyendo el riesgo de cambios en el color y dispersión del pigmento inyectado.

4. OBJETIVOS DE TRABAJO

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

2. Comprobar la tolerancia a estos pigmentos desde la perspectiva clínica, histopatológica e inmunológica.

3. Estudiar en un modelo experimental adecuado, el abanico de colores de pigmentos minerales micronizados disponibles actualmente para su empleo en la queratopigmentación con fines tanto cosméticos como terapéuticos.

4. Comprobar en un modelo experimental adecuado, la tolerancia y comportamiento anatomopatológico del pigmento mineral micronizado. 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 minerales micronizados.

5. Desarrollo de un método de simulación por ordenador para la queratopigmentación con finalidad cosmética, que permita predecir el resultado final tras la pigmentación con un color determinado, dependiendo del color del iris del paciente.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Estudio experimental en un modelo animal

5.1.1. Materiales

Como modelo experimental se utilizaron 28 ojos de 14 conejos albinos New Zealand (Figura 32) crecidos en la Granja San Bernardo en España, con un peso medio de 3 Kg en perfecto estado de salud, bajo la supervisión médica e higiénico-sanitaria del personal del animalario de la Universidad Miguel Hernández y también supervisado por el equipo de Investigación y Desarrollo de Vissum Corporación Oftalmológica. A todos los conejos albinos se les realizó la queratopigmentación intraestromal en quirófano, en condiciones de asepsia y antisepsia, bajo anestesia general y tópica.

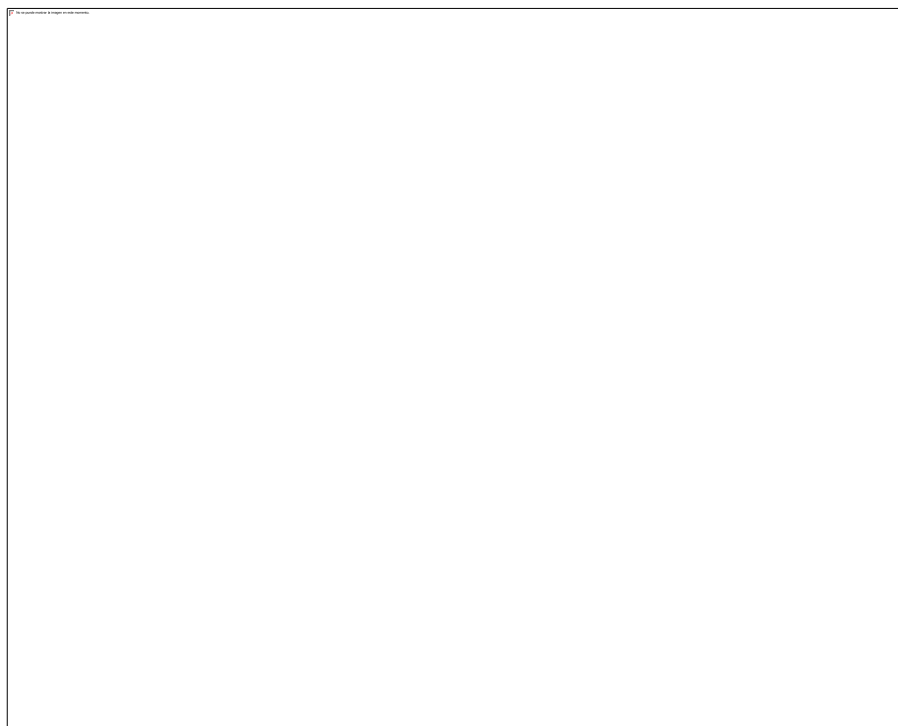


Figura 32: Conejo de raza albina (*Oryctolagus cuniculus*)

La queratopigmentación se realizó utilizando como herramienta de tinción los pigmentos micronizados minerales. Los pigmentos utilizados para realizar las

mezclas de colores fueron diluidos como se indica a continuación. Se utilizaron los siguientes colores base:

- Azul
- Marrón claro
- Verde
- Marrón oscuro
- Blanco

A continuación se explica la preparación de los pigmentos para su utilización posterior.

Como los colores son espesos y no se pueden pipetear adecuadamente con micropipeta de 10-100 µl, se vacía el contenido del vial en Eppendorf estériles y se les agrega 2 ó 3 gotas de BSS por Eppendorf.

Los pigmentos eran siempre agitados con vortex para que la mezcla fuera lo mas homogénea posible.

Es todas las tinciones se utilizaba una mezcla inicial llamada *Color de Base* que se inyectaba intraestromalmente, siendo este color de base parcialmente lavado con BSS intraestromal, para obtener un resultado menos homogéneo del color, por tanto un aspecto más reticulado e irregular, dando como resultado un color más natural. Seguidamente se lavaba con otra mezcla de color llamada *Color de Lavado* para conseguir una superposición de dos colores, dando un aspecto más real y parecido a un iris normal.

Modo de preparación de los Colores de Base:

- Azul claro: 30 µl Azul 255 + Blanco 700 diluido (1ml BSS + 50µl Blanco 700).
- Verde: Verde 240 diluido (1ml BSS + 50µl Verde 240).
- Pardo: Marrón claro 150 diluido (1ml BSS + 50µl Marrón claro 150).
- Azul oscuro: 1ml BSS + 25µl Azul 255 + 50µl blanco 700 + 25µl Marrón claro 150.

Modo de preparación de los Colores de Lavado:

- Marrón claro de lavado: Marrón claro 150 diluido (1ml BSS + 50µl Marrón claro 150).
- Marrón oscuro de lavado: Marrón oscuro 180 diluido (1ml BSS + 50µl Marrón oscuro 180).
- Azul de lavado: Azul 255 muy diluido (20µl Azul 255 + 1ml BSS).
- Verde de lavado: Verde 240 diluido (1ml BSS + 50µl Verde 240).

Mezclas finales (Color de Base + Color de Lavado):

- Azul claro: Azul claro + Marrón claro de lavado.
- Verde: Verde + Marrón oscuro de lavado.
- Pardo azulado: Pardo + Azul de lavado.
- Pardo verdoso: Pardo + Verde de lavado.
- Azul oscuro: Azul oscuro. En este caso no se realiza lavado posterior con otro color.

5.1.2. Métodos

En los 28 ojos de los 14 conejos se realizó la técnica de queratopigmentación intraestromal (Figura 33) intentando reproducir la forma y el color del iris utilizando diversos colores en dilución. Se utilizaron tres ojos como controles, dos de ellos se les practicó únicamente el procedimiento quirúrgico (túnel intraestromal) pero sin la introducción del pigmento, a los cuales se les llamó “pocket”, y al tercero de los controles no se le practicó experimento alguno.

El experimento se realizó en dos etapas, la primera etapa consistió en la cirugía de 10 conejos (20 ojos) y en la segunda etapa se realizó la cirugía de los 4 conejos restantes (8 ojos).

Tras la queratopigmentación se revisaron los ojos tratados bajo lámpara de hendidura y se fotografiaron los resultados, a la semana, al mes, a los dos meses y a los tres meses, para evaluar las siguientes variables:

- Presencia y grado de inflamación (Hiperemia conjuntival y turbidez corneal).
- Angiogénesis (Grado de neovascularización).
- Defecto epitelial medido en milímetros.

5.1.3. Procedimiento quirúrgico

Las cirugías fueron realizadas por la autora de la presente tesis doctoral en los quirófanos del animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante) bajo microscopio quirúrgico Leica, con el cual se realizaron las fotografías de todos los animales tratados.

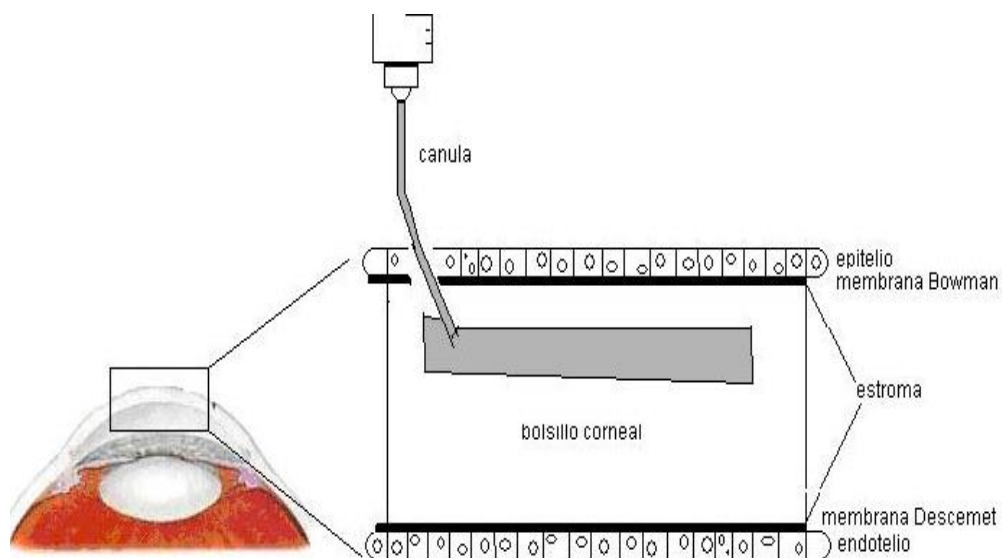


Figura 33: Técnica de queratopigmentación intralamelar

El procedimiento constaba de las siguientes etapas:

Etapa 1: Anestesia

- Sistémica intramuscular: Ketamina 40 mg/Kg + Xilacina 10 mg/Kg.
- Tópica: Oxibuprocaina/Tetracaína (Anestésico doble Cusí, Alcon).

Etapa 2: Técnica quirúrgica

Bajo anestesia general y tópica, asepsia y antisepsia se realiza en todos los casos una queratopigmentación periférica, dicha pigmentación no debe cubrir el área pupilar para no causar ceguera en el animal.

Paso 1: Marcado pupilar

Para ello se marca el centro de la córnea y la circunferencia pupilar con la ayuda de un compás y un marcador de zona óptica RK de 5 mm (katena, New York, EEUU).

Paso 2: Incisión

Se realiza una incisión radial *Freehand* (Manos Libres) en la córnea con un cuchillito estándar de 45° (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU) alcanzando el estroma medio, radialmente, desde el límite de la pupila previamente dibujado hasta llegar a 1 mm del limbo.

Paso 3: Túnel intraestromal

A partir de esta incisión radial, se disecciona la córnea intraestromalmente y concéntricamente desde la periferia hasta el área pupilar marcada (sin sobrepasar este límite pupilar previamente marcado), aproximadamente al 50% de la paquimetría, con un cuchillito mini crescent (Sharpoint, Surgical Specialties Corporation, Reading, PA; EEUU). Con la ayuda de un disector helicoidal (*CPK corneal spiral dissector, Epsilon, Irvine CA, USA*) se continúa diseccionando en el mismo plano intraestromal circunferencialmente siguiendo el recorrido del iris (es decir cubriendo el iris pero no la pupila) dejando intacto el área pupilar, 180° en sentido horario y 180° en sentido antihorario.

Paso 4: Colocación de los pigmentos

Se aplica el Color de Base seguido del Color de Lavado con una cánula de irrigación de 23G. El procedimiento finalizaba cuando se conseguía el color adecuado.

Paso 5: Profilaxis antibiótica

Se aplicaron los siguientes colirios por vía tópica: Ciprofloxacino hidrocloreto (antibiótico) 3 mg/ml (Oftacilox, Alcon), Ciclopentolato hidrocloreto (analgésico midriático) 10 mg/ml tópico (Colircusí Cicloplejico, Alcon) y Cloranfenicol pomada (Oftalmolosa Cusi, Alcon).

Es importante recalcar que la queratopigmentación se realizó en todos los casos sin suturas. Tras cada procedimiento se realizaban fotografías con microscopio quirúrgico.

Resumen de la Técnica quirúrgica

1. Marcado del área pupilar de 5 mm con rotulador quirúrgico.
2. Incisión radial con cuchillete hasta aproximadamente 200 micras de profundidad desde borde pupilar marcado hasta 2 mm del limbo.
3. Disección intralamelar aproximadamente al 50% de la paquimetría, haciendo un túnel intraestromal con disector de córnea (*CPK corneal spiral dissector, Epsilon, Irvine CA, USA*) 180° en sentido horario y 180° en sentido anti-horario, respetando el área pupilar de 5 mm marcada previamente.
4. Inyección del Color de Base + Color de lavado seleccionado utilizando una jeringa de 1 ml y una cánula de 23G.

5.1.4. Protocolo postoperatorio

Tratamiento postquirúrgico

Durante la primera semana se instilaron gotas de Ciprofloxacino hidrocloreto (antibiótico) 3 mg/ml (Oftacilox, Alcon) dos veces al día y se colocó Cloranfenicol pomada (Oftalmolosa Cusi, Alcon) dos veces al día. Durante los primeros tres días se trataron de la misma forma con Ciclopentolato hidrocloreto (analgésico midriático) 10 mg/ml tópico (Colircusí Cicloplejico, Alcon) dos veces al día. El tratamiento analgésico consistió en Buprenorfina 0,05 mg/kg una inyección vía

subcutánea dos veces al día durante dos días y Paracetamol 100 mg/100ml en el agua de bebida durante siete días.

Seguimiento postquirúrgico

Los animales fueron examinados bajo anestesia general, usando el mismo protocolo farmacológico-anestésico que durante las cirugías, con el microscopio quirúrgico Leica y la lámpara de hendidura, para evaluar las variables a estudiar y determinar cualquier complicación asociada. Todo ello se realizó a la primera semana, primer mes, segundo mes y tercer mes tras la cirugía, momento en el que se procedió al sacrificio de los animales.

5.1.5. Variables principales a estudiar en el experimento

Las variables que se cuantificaron y analizaron en cada revisión fueron las siguientes:

- Hiperemia conjuntival
- Turbidez corneal
- Neovascularización corneal
- Defecto epitelial medido en milímetros

Durante el seguimiento se analizaron los siguientes datos a través del siguiente protocolo de supervisión. Cabe destacar que la supervisión fue realizada por un mismo observador durante todo el experimento.

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

En cada visita se evaluó la mejoría en el aspecto cosmético, la homogeneidad y permanencia del pigmento intraestromal, así como el estado general de los animales.

5.1.6. Instrumental quirúrgico utilizado

En la Figura 34 se observan la mayoría de los instrumentos utilizados durante la cirugía para lograr la queratopigmentación intraestromal. En esta figura podemos observar: Marcadores pupilares de titanio de diferentes diámetros (\varnothing 3,0 mm, \varnothing 3,5 mm, \varnothing 4,0 mm), para la creación del túnel intraestromal se utilizaron los disectores helicoidales de titanio derecho e izquierdo, también llamados disectores en “cola de cerdo” por su forma peculiar que permite diseccionar la córnea en ambos sentidos. Otros disectores de titanio utilizados eran rectos, o para la derecha e izquierda, o uno plano de 90°. También se puede observar en esta figura, el blefaroestato utilizado de titanio (Speculum) y otros tres marcadores pupilares de acero y un cuchillete de zafiro de 400 μ para la primera incisión corneal radial.



Figura 34: Instrumental necesario para la queratopigmentación

5.2. Estudio histopatológico en modelo animal

5.2.1. Métodos

El estudio histológico de cada ojo fue completo y siguiendo una metodología impecable, con descripción del estado de cada estructura corneal.

En el siguiente apartado se mencionarán los cambios anatomopatológicos que presentaron los ojos tratados, los ojos controles y los pocket, analizando la tolerancia de los pigmentos minerales micronizados inyectados en el estroma corneal, siguiendo los siguientes criterios de evaluación: presencia y distribución de células inflamatorias, presencia o ausencia de neovascularización, localización del pigmento en el grosor del estroma corneal, y por último presencia o ausencia de difusión del pigmento.

Las muestras se procesaron en formol tamponado al 10%. Previo al procesamiento de las muestras, se realizó un corte del globo ocular con cuchilla de

microtomo, dividiéndolo el mismo en dos mitades y alojando dichas mitades en casetes para su procesamiento.

El procesamiento se realizó siguiendo las siguientes etapas:

- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 90 minutos XILOL
- 90 minutos XILOL
- 90 minutos XILOL
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C

Las muestras fueron cortadas con un microtomo de rotación, obteniendo cortes histológicos de un grosor de 5 µm, recogiendo cada corte con un intervalo de 100 µm y alojando al menos 3 cortes en cada portaobjetos tratado con poli-lisina. Todos los cortes fueron secados en estufa a 37°C durante 48 horas.

Los cortes histológicos fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina (HE) siguiendo un protocolo estándar para dicha tinción, para su posterior análisis por microscopía con un microscopio Nikon Eclipse E 400.

5.3. Estudio microscópico confocal en modelo animal

5.3.1. Materiales y métodos

Para el examen de microscopia confocal se utilizó como instrumento el Confoscan P4 (NIDEK), con una lente de aumento de 40X. Para ello se instiló en la

superficie corneal el gel líquido Viscotear (Novartis Farmacéutica S.A. Barcelona, España).

Se evaluaron los ojos operados con tatuaje corneal y también los casos controles y los pockets (es decir aquéllos en los que se realizó el procedimiento quirúrgico, sólo incisiones y disección intraestromal, pero a los que no se les inyectó el pigmento).

5.4. Estudio inmunológico del pigmento utilizado

5.4.1. Materiales y métodos

El pigmento utilizado en el presente trabajo fue sometido a una evaluación in vitro por medio del test de inflamación en células mononucleares humanas de sangre periférica (PMBCs), con el objetivo de observar la respuesta inflamatoria de dichas células a los diferentes pigmentos por medio de cultivo.

La estrategia consistía en aislar PMBCs humanas procedentes de Buffy coats (capa leucocitaria), exponerlas toda la noche durante 16 horas a los pigmentos negro (utilizado como control) y a una mezcla de los pigmentos coloreados (problema). Posteriormente se procedía a recoger el sobrenadante y analizar las citoquinas producidas por dichas células.

Para ello se siguió el siguiente protocolo:

- Aislamiento de PMBCs a partir de buffy Coat por gradientes de Ficoll.
- Dilución de los pigmentos por saturación en medio BSS (solución stock).
 - Mezcla control: 1ml BSS + 175ul Stock negro (control)
 - Mezcla problema: 1ml BSS + 50ul Blanco + 50ul Marron + 25ul Azul + 50ul Verde (problema)
- Incubación de 40ul de las mezclas control y problema en 1ml de RPMI con 3×10^6 PMBCs durante 16 horas.

- Análisis de las citoquinas del sobrenadante por BD™ Cytometric Bead Array (CBA).

Los resultados de este estudio inmunológico serán discutidos en el siguiente apartado.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados experimentales

6.1.1. Primer experimento

En esta primera etapa como se ha explicado anteriormente se realizó la cirugía en 20 ojos (10 conejos), los cuales fueron revisados a la semana, al mes, a los 2 meses y a los 3 meses.

Los resultados de la primera semana se muestran en la tabla 3 a continuación.

Conejo N°	1ra SEMANA		Hiperemia	Defecto epitelial	NV	Turbidez corneal
1	OD: Azul		2	1mm	0	2
	OI: Pocket		0	0	0	0
2	OD: Verde		1	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
3	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		1	0	0	0
4	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
5	OD: Azul		2	1mm	0	2
	OI: Pardo A		0	0	0	0
6	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		3	1mm	0	2
7	OD: Azul		3	0	0	2
	OI: Pardo A		0	0	0	0
8	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pocket		1	0	0	2
9	OD: Pardo A		2	0	0	2
	OI: Pardo V		0	0	0	0
10	OD: Azul		1	0	0	0
	OI: Control		0	0	0	0

Tabla 2: Resultados primera semana tras la cirugía.

Se observó una buena evolución en todos los casos que se detallará a continuación. 9 ojos presentaban cierto grado de hiperemia como cabría esperar en cualquier postoperatorio inmediato, 4 de ellos de grado leve, 3 grado moderado y solo 2 de ellos hiperemia severa. 3 ojos presentaban un defecto epitelial coincidiendo con el área de la incisión principal. 6 ojos presentaban turbidez corneal moderada. Sin embargo en ninguno de los casos se observaron signos de neovascularización.

Conejo Nº	1er MES		Hiperemia	Defecto epitelial	NV	Turbidez corneal
1	OD: Azul		1	0	0	1
	OI: Pocket		0	0	0	0
2	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
3	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
4	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
5	OD: Azul	Sacrificado	0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
6	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
7	OD: Azul		1	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
8	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pocket		0	0	0	0
9	OD: Pardo A		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
10	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Control		0	0	0	0

Tabla 3: Resultados primer mes tras la cirugía.

Los resultados del primer mes se muestran en la tabla 4. La evolución de los 20 ojos fue satisfactoria. Sin embargo, hubo que sacrificar al conejo número 5 por un

problema renal ajeno a este experimento. En este momento solo 2 ojos (10%) presentaban un mínimo grado de hiperemia (grado leve en ambos casos). Otro ojo (5%) un mínimo grado de turbidez corneal (grado 1: edema leve).

Conejo N°	2do y 3er MES		Hiperemia	Defecto epitelial	NV	Turbidez corneal
1	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pocket		0	0	0	0
2	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
3	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
4	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
5	OD: Azul	Sacrificado	0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
6	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
7	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
8	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pocket		0	0	0	0
9	OD: Pardo A		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
10	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Control		0	0	0	0

Tabla 4: Resultados segundo y tercer mes tras la cirugía.

La evolución favorable y los resultados del segundo mes se muestran en la tabla 5, que se mantuvieron inalterados en la revisión del tercer mes. En la revisión del segundo mes, los casos de hiperemia conjuntival y de turbidez corneal se habían resuelto por completo. Ningún ojo presentaba signos de neovascularización y en este momento cualquier defecto epitelial en el área de la incisión se había resuelto.

En la figura 34 se observan algunos de los resultados del examen clínico al segundo mes tras la cirugía y la figura 35 al tercer mes tras la cirugía. En dichas fotografías se pueden observar los cuatro colores que se obtuvieron al mezclar los pigmentos, como se explica en apartados anteriores: Azul, Verde, Pardo azulado y Pardo verdoso.

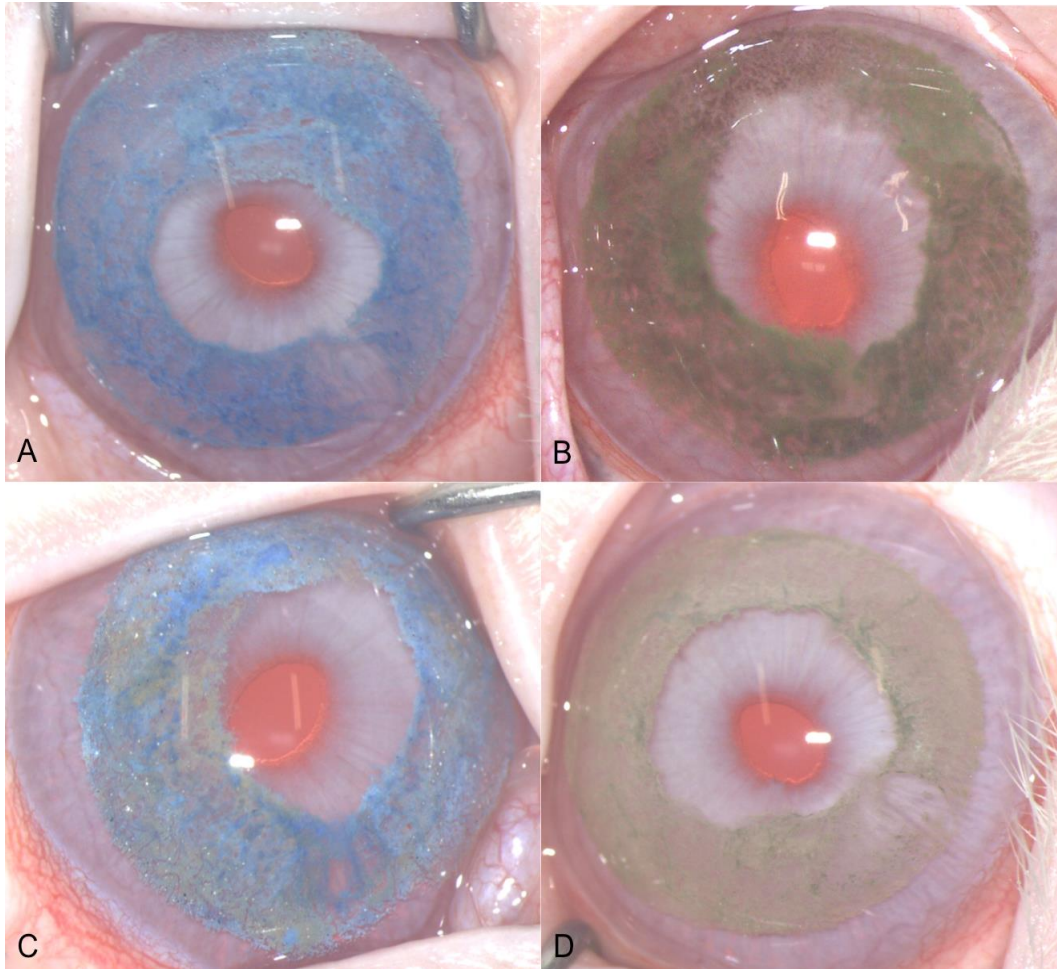


Figura 34: Fotografías 2 meses tras la cirugía. A: Azul, B: Verde, C: Pardo azulado, D: Pardo verdoso.

Al momento de la eutanasia según la fecha programada para cada experimento (a los tres meses) todas las córneas eran transparentes. En el lugar en el que se había inyectado el pigmento no se observaron signos de edema corneal, el pigmento mostraba buen aspecto cosmético, sin dispersión del mismo, compacto y bien delimitado. Tampoco se observaron signos de neovascularización, como se ha explicado previamente.

En todos los casos, incluso en aquellos en los que no se aplicó pigmento en el bolsillo corneal intraestromal (ojos control o “pocket”), los resultados fueron los mismos, y los leves signos inflamatorios (hiperemia conjuntival y edema corneal)

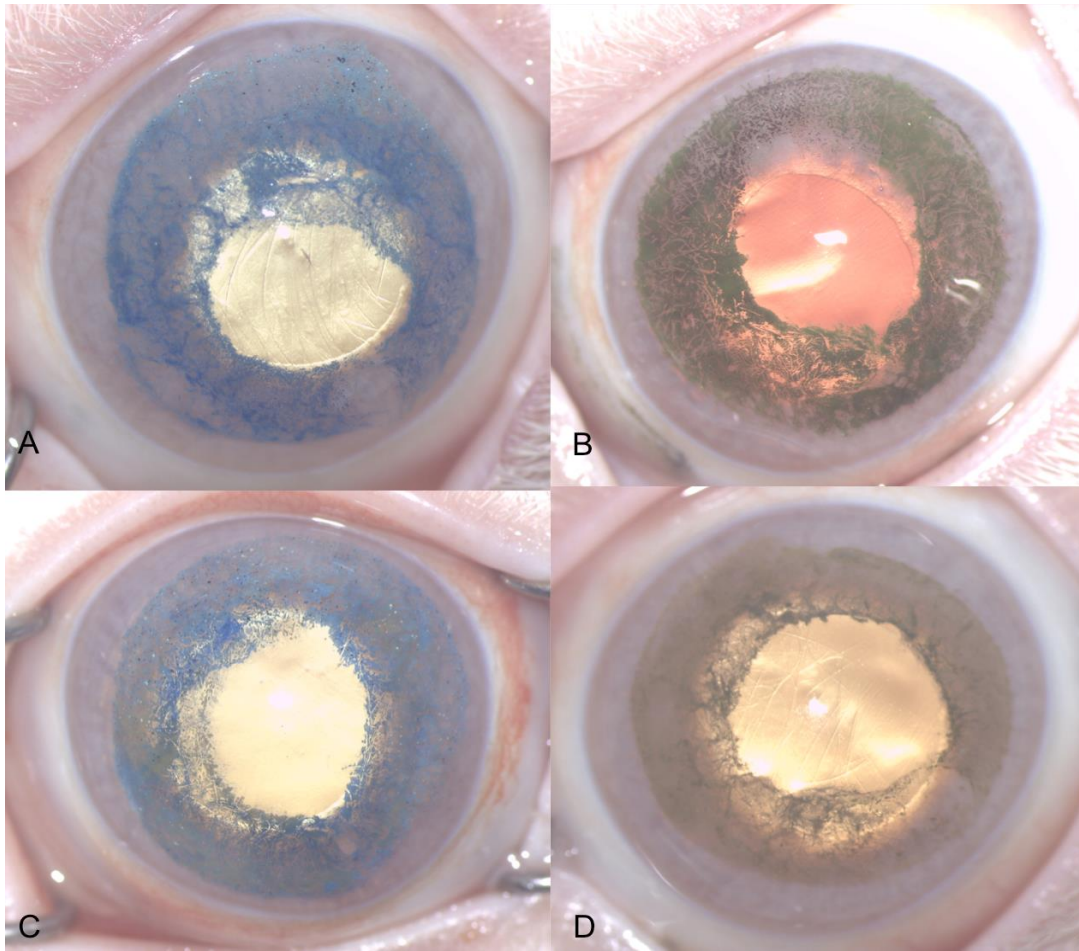


Figura 36: Fotografías 3 meses tras la cirugía. A: Azul, B: Verde, C: Pardo azulado, D: Pardo verdoso.

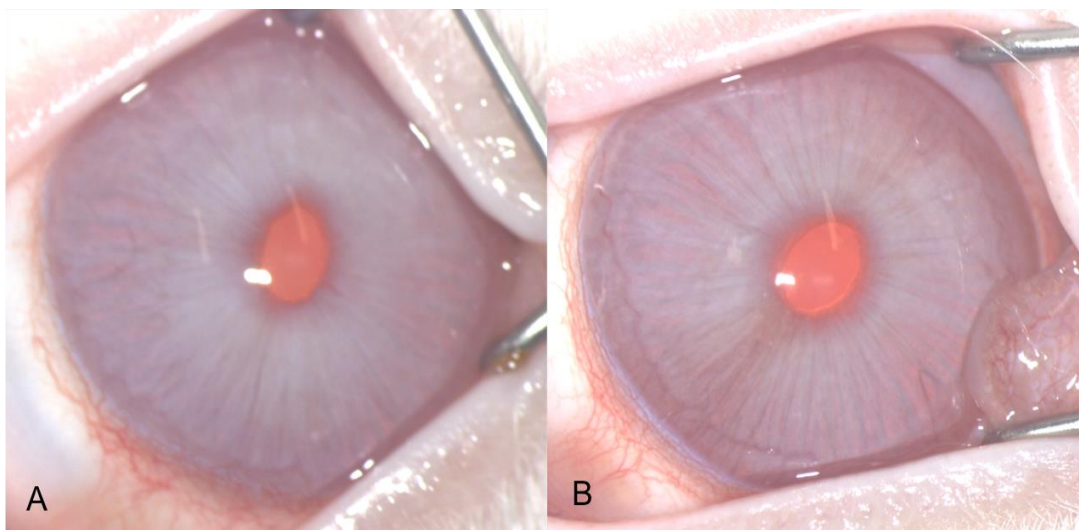


Figura 36: A: Ojo pocket (cirugía sin pigmento), B: Ojo control.

desaparecieron completamente con la ayuda del tratamiento postoperatorio adecuado.

En la figura 36 se muestra un ejemplo de un ojo control (Figura 36B) en el cual no se realizó la cirugía; y otro ojo en el cual se realizó la cirugía sin la posterior inyección del pigmento (Figura 36A: "pocket"), no observándose diferencias entre dichas imágenes.

6.1.2 Segundo experimento

En esta etapa se realizó la misma cirugía en 8 ojos (4 conejos), los cuales fueron igualmente revisados bajo lámpara de hendidura, a la semana, al mes, a los 2 meses y a los 3 meses.

Los resultados de la primera semana se muestran en la tabla 6 a continuación. No hubo complicaciones postoperatorias inmediatas, ni signos de infección en ninguno de los ojos. Se tomaron medidas profilácticas adicionales para evitar el riesgo de infección relacionada al acto quirúrgico, que serán mencionadas en el apartado de la discusión. De los 8 ojos tratados, solo 2 ojos (25%) presentaban un mínimo grado de hiperemia (grado 1 y 2) como cabría esperar en cualquier postoperatorio inmediato, solo 1 ojo (12,5%) presentaba un defecto epitelial coincidiendo con la incisión principal, el cual también presentaba un grado 2 de turbidez corneal. No hubo signos de neovascularización en ninguno de los casos tratados.

Conejo N°	1ra SEMANA		Hiperemia	Defecto epitelial	NV	Turbidez corneal
11	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
12	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		1	0	0	0
13	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
14	OD: Azul		2	1	0	2
	OI: Pardo A		0	0	0	0

Tabla 5: Resultados primera semana tras la cirugía.

Los resultados del primer mes se muestran en la tabla 7, mostrando una evolución satisfactoria en todos los casos. Los resultados se mantuvieron inalterados durante las siguientes revisiones a los 2 meses y a los 3 meses.

Conejo Nº	1er MES		Hiperemia	Defecto epitelial	NV	Turbidez corneal
11	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
12	OD: Verde		0	0	0	0
	OI: Pardo V		0	0	0	0
13	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0
14	OD: Azul		0	0	0	0
	OI: Pardo A		0	0	0	0

Tabla 6: Resultados primer mes tras la cirugía.

A continuación se exponen fotografías de los conejos pigmentados con los 4 colores obtenidos tras mezclar los pigmentos, como se comentó en apartados anteriores, a los dos meses tras la cirugía y a los tres meses tras la cirugía.

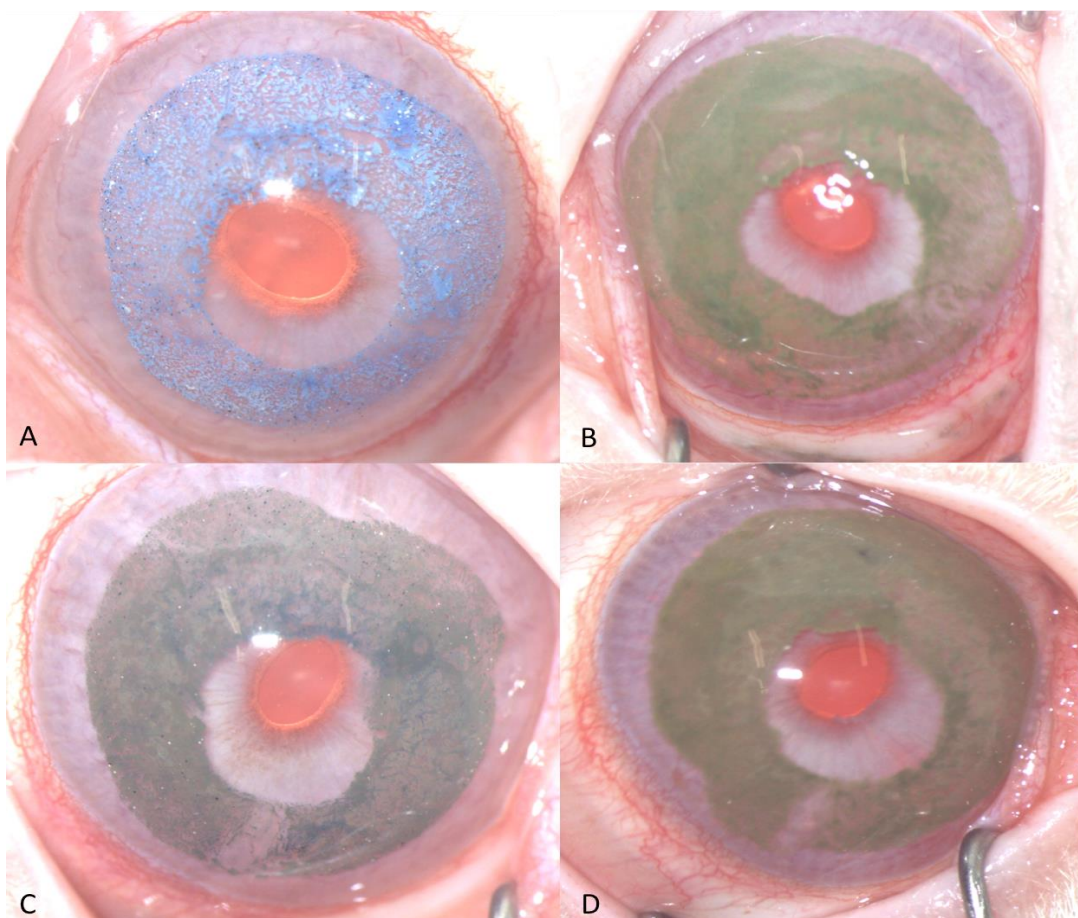


Figura 37: Fotografías 2 meses tras la cirugía.

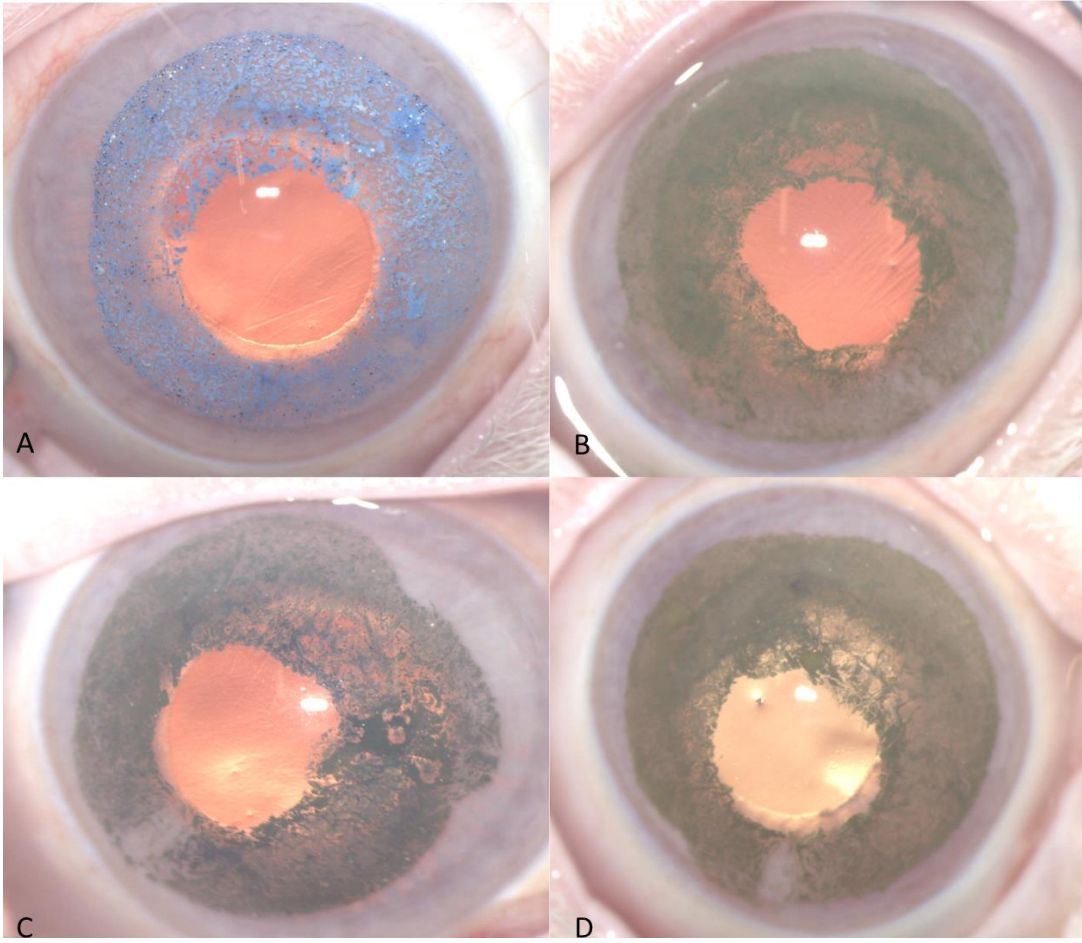


Figura 38: Fotografías 3 meses tras la cirugía.

6.2. Resultados histopatológicos

El estudio histológico de cada ojo fue completo y siguiendo una metodología impecable, con descripción del estado de cada estructura corneal.

En este apartado se mencionarán los cambios anatomopatológicos que presentaron los ojos tratados, los ojos controles y los pocket, analizando la tolerancia a los pigmentos minerales micronizados inyectados en el estroma corneal, siguiendo los siguientes criterios de evaluación: presencia y distribución de células inflamatorias, presencia de neovascularización, localización del pigmento en el grosor del estroma corneal, y por último difusión del pigmento.

Las muestras fueron recibidas en formol tamponado al 10%. Previo al inicio del procesamiento de las muestras, se realizó un corte del globo ocular con cuchilla de microtomo, dividiéndolo en dos mitades y alojando dichas mitades en casetes para su procesamiento.

El procesamiento se realizó cumplimentando las siguientes etapas:

- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 60 minutos Etanol absoluto
- 90 minutos XILOL
- 90 minutos XILOL
- 90 minutos XILOL
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C
- 2 horas parafina (P.F. 56-58 °C) a 62°C

Las muestras fueron cortadas con un microtomo de rotación, obteniendo cortes histológicos de un grosor de 5 µm, recogiendo cada corte con un intervalo de 100

µm y alojando al menos 3 cortes en cada portaobjetos tratado con poli-lisina. Todos los cortes fueron secados en estufa a 37°C durante 48 horas.

Los cortes histológicos fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina (HE) siguiendo un protocolo estándar para dicha tinción, para su posterior análisis por microscopía con un microscopio Nikon Eclipse E 400.

Los resultados de los 12 ojos que completaron el experimento, cuyo sacrificio se realizó a los 3 meses se describen a continuación:

- El epitelio corneal estaba íntegro, sin úlceras, ni erosiones, ni edema celular remarcable. No encontramos hiperplasia, ni atrofia, es decir se mantenía el espesor normal, entre 3-5 células.

- 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 pequeños granulos finos pigmentados.

- El estroma corneal tanto en los ojos queratopigmentados como en los casos controles no presentaba fibrosis cicatricial, 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 y en menor cuantía el tipo III.

- La matrix extracelular del estroma se mantuvo intacta, y en la porción media del estroma corneal se evidenció en todos los ojos tatuados la presencia lineal de pigmento. La cohesividad del pigmento fue demostrada, aunque en algunas áreas, el pigmento formaba cúmulos más densos, pero sin repercutir en al aspecto

cosmético final. Los bordes de la zona pigmentada eran bien definidos, es decir sin dispersión.

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

En las siguientes imágenes (Figura 39) se pueden observar lo siguiente: A. Conejo 1, ojo izquierdo: estroma corneal sin alteraciones histológicas, en pocket sin pigmento. B. Conejo 6, ojo derecho (verde): profundidad del pigmento a 0,17 mm. C. Conejo 7, ojo izquierdo (pardo azulado): profundidad del pigmento 0,30 mm. D. Conejo 9, ojo izquierdo (pardo verdoso): profundidad del pigmento 0,10 mm. En todas las imágenes se evidencia la ausencia de inflamación y neovascularización.

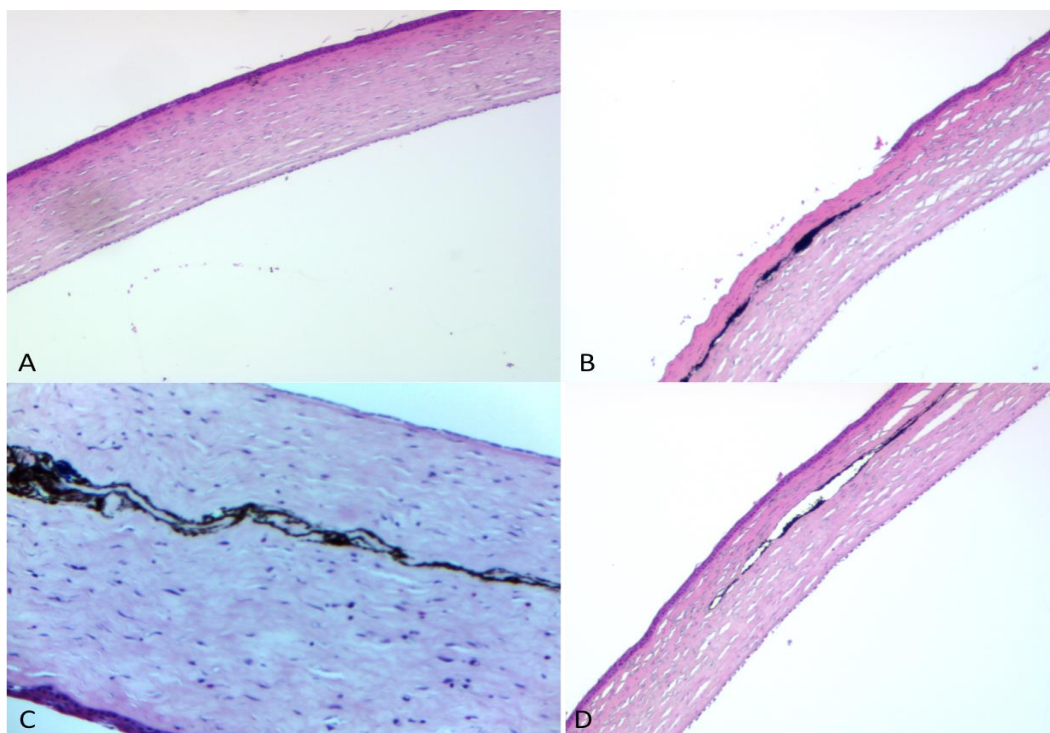


Figura 39: A: Conejo 1, B: Conejo 6, C: Conejo 7, D: Conejo 9.

Conejo N°	Color	Profundidad del pigmento (mm)	Dispersión/dehiscencia (0 a 3)	Vasos (NV 0 a 3)	Inflamación (0 a 3)
1	OD: Azul	0,15	0	0	0
	OI: Pocket	Pocket (control)	0	0	0
2	OD: Verde	0,15	0	0	0
	OI: Pardo V	0,14	0	0	0
3	OD: Azul	0,16	0	0	0
	OI: Pardo A	0,16	0	0	0
4	OD: Verde	0,15	0	0	0
	OI: Pardo V	0,17	0	0	0
5	OD: Azul	0,13	0	0	0
	OI: Pardo A	0,10	1	0	0
6	OD: Verde	0,17	0	0	0
	OI: Pardo V	0,17	1	0	0
7	OD: Azul	0,30	0	0	0
	OI: Pardo A	0,30	0	0	0
8	OD: Verde	0,17	0	0	0
	OI: Pocket	Pocket (control)	0	0	0
9	OD: Pardo A	0,20	0	0	0
	OI: Pardo V	0,20	1	0	0
10	OD: Azul	0,17	0	0	0
	OI: Control	Control	0	0	0
Total 20		Promedio 0,175 mm	Total 3 15%	Total 0 0%	Total 0 0%

Tabla 8: Resultados histológicos del primer experimento al tercer mes tras la cirugía.

En la Tabla 8 se pueden observar los datos recogidos durante el análisis histológico, que se realizó en todos los casos en el momento del sacrificio de los animales, al tercer mes tras la cirugía.

La profundidad media del pigmento en milímetros fue de 0,175 mm, en ningún caso se observaron signos de neovascularización ni tampoco signos inflamatorios (infiltrado celular inflamatorio). Solo en 3 casos (15%) se observó dispersión del pigmento, ya que el mismo no se encontraba compactado en una sola capa, si no en varias capas.

La histopatología del conejo 5, sacrificado precozmente por problemas renales ajenos al experimento oftalmológico, como era de esperar, no mostró dispersión del pigmento ni signos inflamatorios ni de neovascularización.

Conejo Nº	Color	Profundidad del pigmento (mm)	Dispersión/dehiscencia (0 a 3)	Vasos (N1V 0 a 3)	Inflamación (0 a 3)
11	OD: Azul	0,15	0	0	0
	OI: Pardo A	0,17	0	0	0
12	OD: Verde	0,13	0	0	0
	OI: Pardo V	0,10	1	0	0
13	OD: Azul	0,15	0	0	0
	OI: Pardo A	0,17	0	0	0
14	OD: Azul	0,15	0	0	0
	OI: Pardo A	0,16	0	0	0
Total 8		Promedio 0,1475 mm	Total 1 12,5%	Total 0 0%	Total 0 0%

Tabla 9: Resultados histológicos del segundo experimento al tercer mes tras la cirugía.

Los resultados histopatológicos del segundo experimento (8 ojos restantes) se muestran en la Tabla 9. La profundidad media del pigmento en milímetros fue de 0,1475 mm, en ningún caso se observaron signos de neovascularización ni tampoco signos inflamatorios (infiltrado celular inflamatorio). Solo en 2 casos (12,5%) se observó un mínimo grado de dispersión del pigmento, ya que el mismo no se encontraba compactado en una sola capa, si no en varias capas.

A continuación se muestran imágenes histológicas de los ojos controles y los tratados con pigmentos que muestran las diferentes estructuras corneales estudiadas.

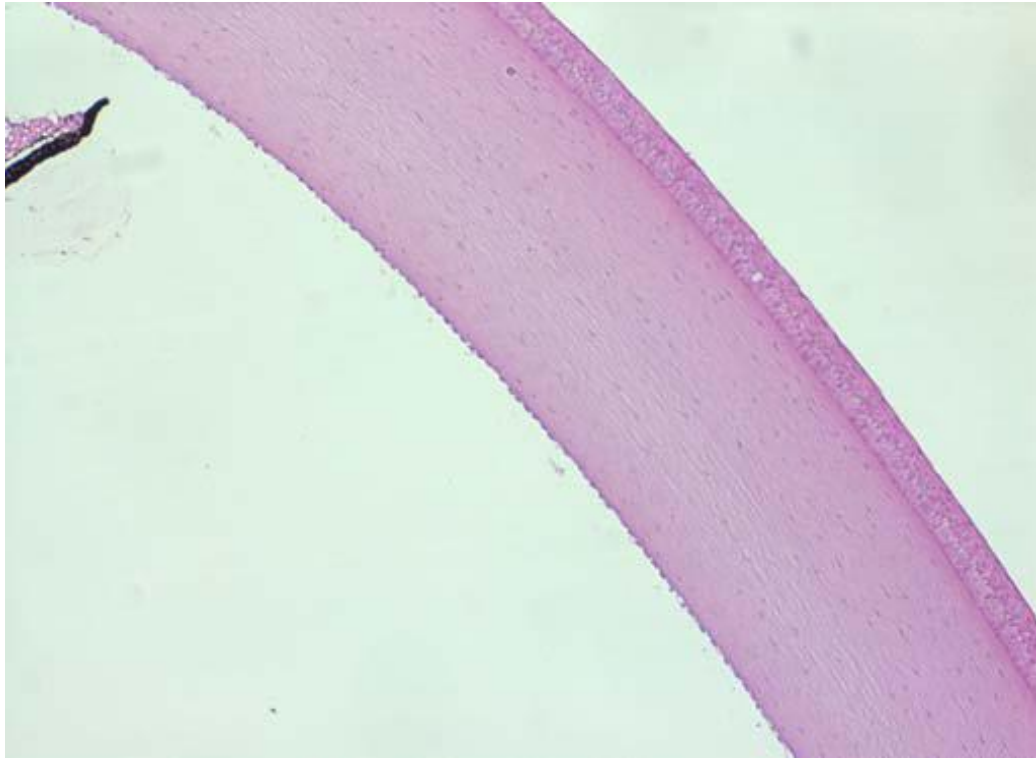


Figura 40: Ojo control. No se observan células inflamatorias, neovascularización ni tampoco cambios en el estroma.

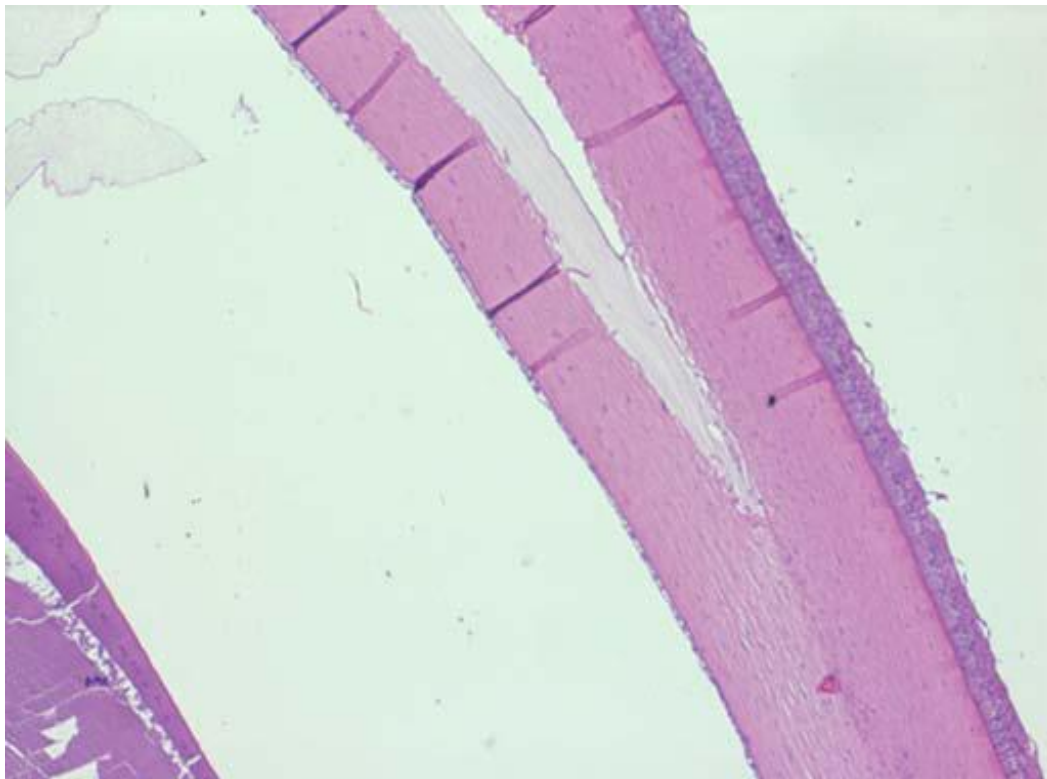


Figura 41: No se observa inflamación. El epitelio y el endotelio están indemnes.

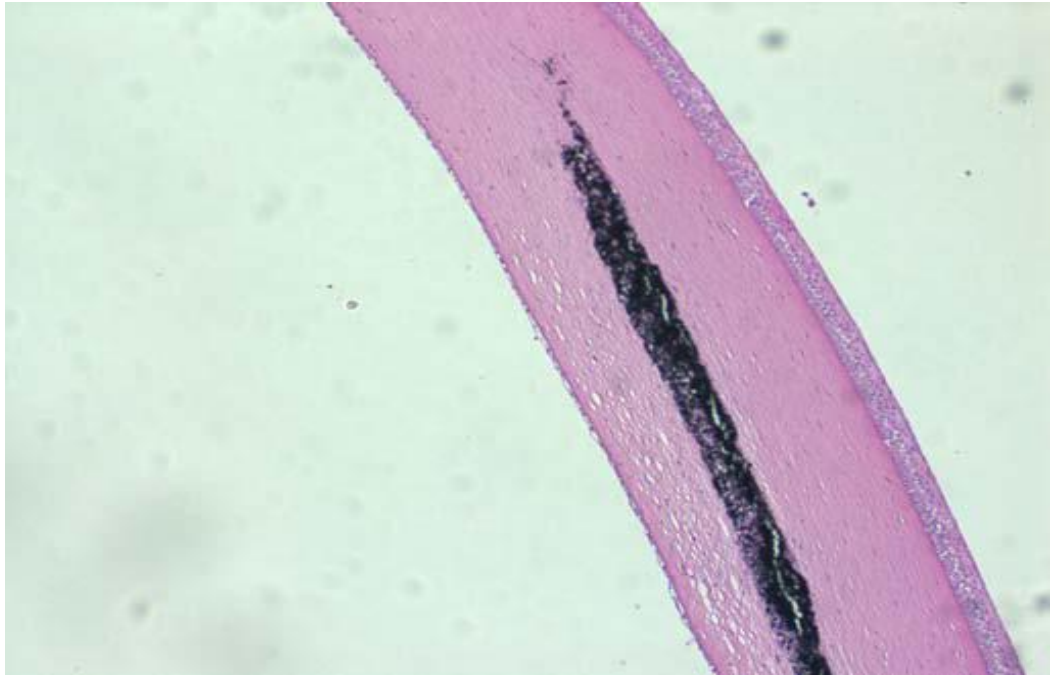


Figura 42: Permanencia del pigmento en perfectas condiciones a los 3 meses de haber realizado la queratopigmentación intraestromal. No hay inflamación ni neovascularización asociada.

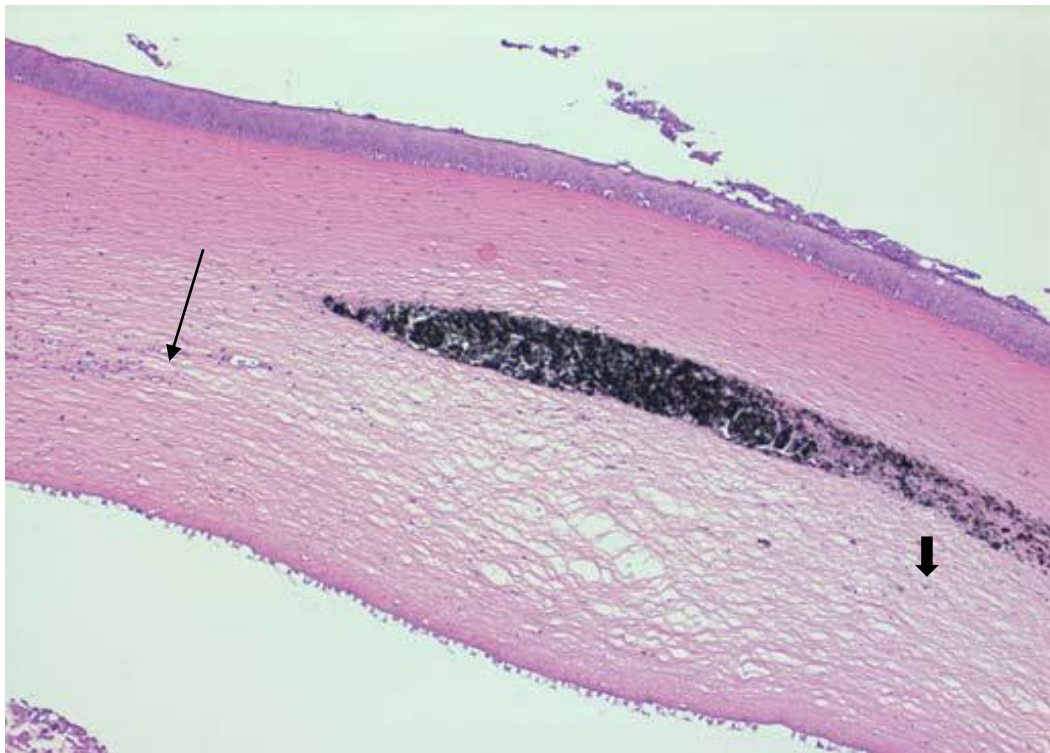


Figure 43: Presencia de leve infiltrado linfocítico en el estroma (flecha larga). Se observan queratocitos activados con núcleos de mayor tamaño (flecha corta).

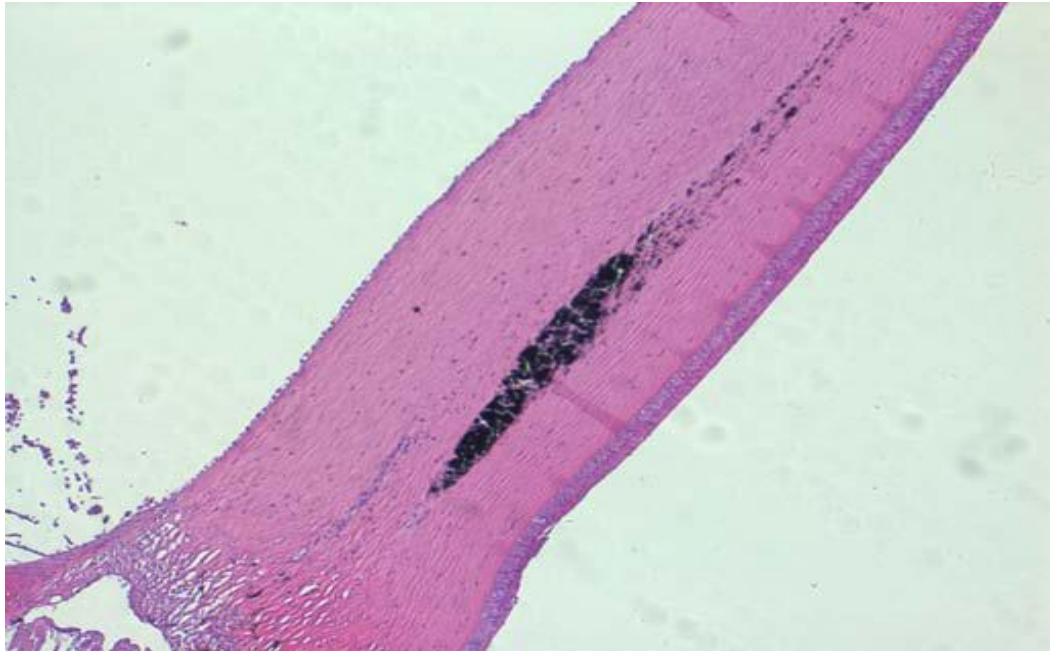


Figura 44: El pigmento permanece 3 meses tras la cirugía y en algunos sitios predominan los cúmulos densos y en otros son más finos y menos abundantes. Sin embargo no hay dispersión del pigmento.

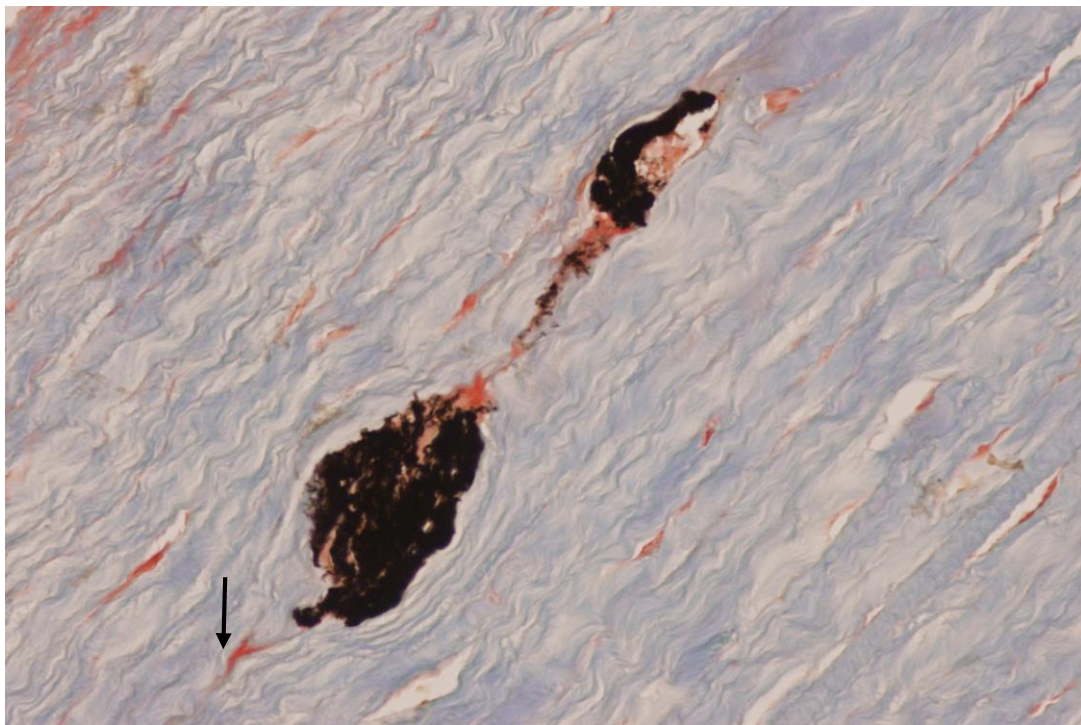


Figura 45: Con tinción tricrómico de Masson. El pigmento permanece en el estroma, sin dispersión pero con disposición en cúmulos de variable tamaño. Alrededor del pigmento se reconocen queratocitos activados (flecha) y algunas células neuronales.

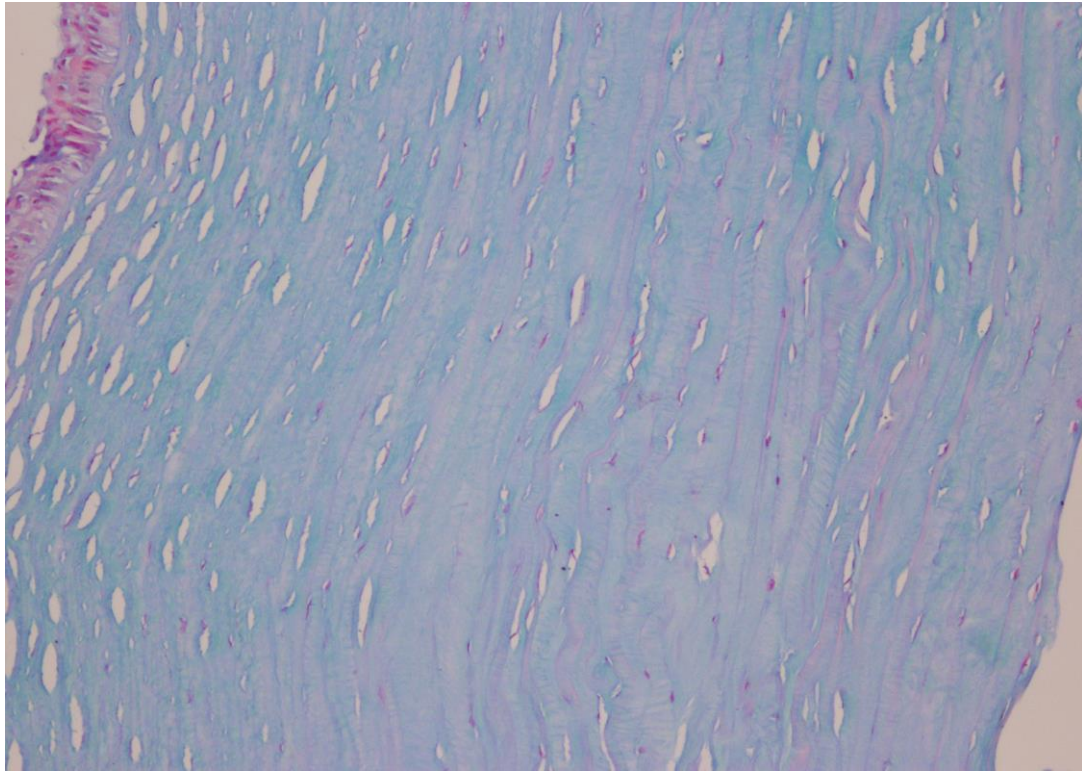


Figura 46: Tinción de Azul Alcian. No existen cambios en la matriz estromal.

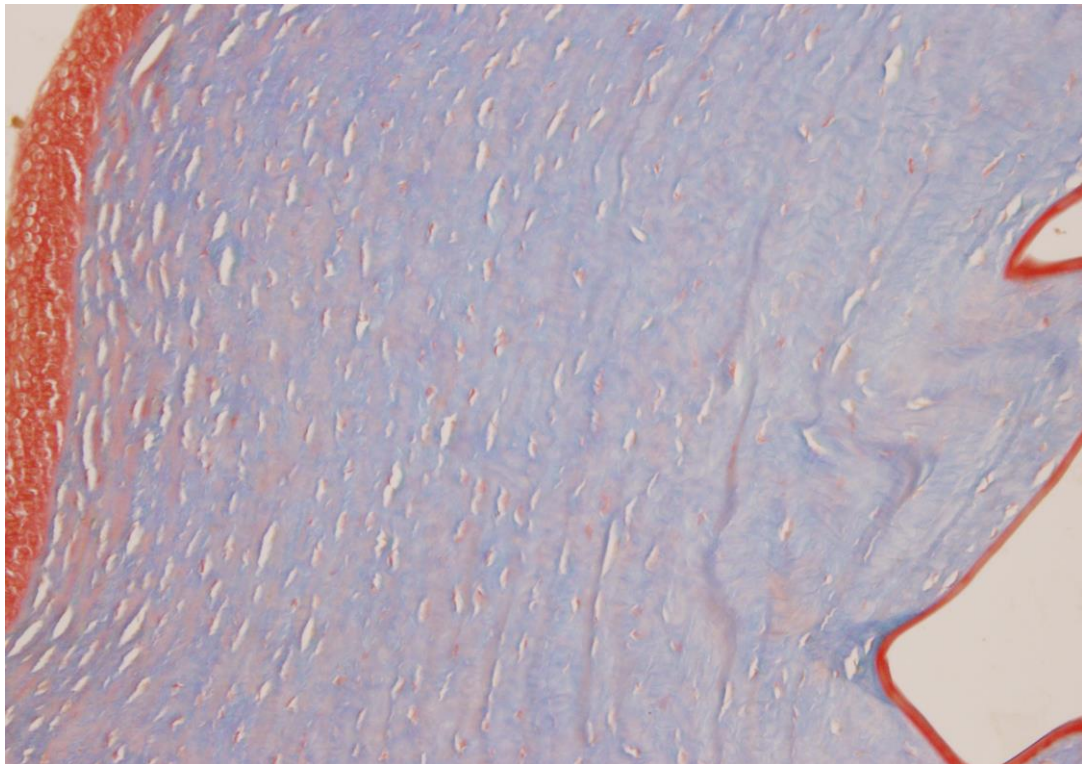


Figura 47: Tinción de Tricrómico de Masson. No se observa alteraciones en el colágeno estromal ni focos de fibrosis.

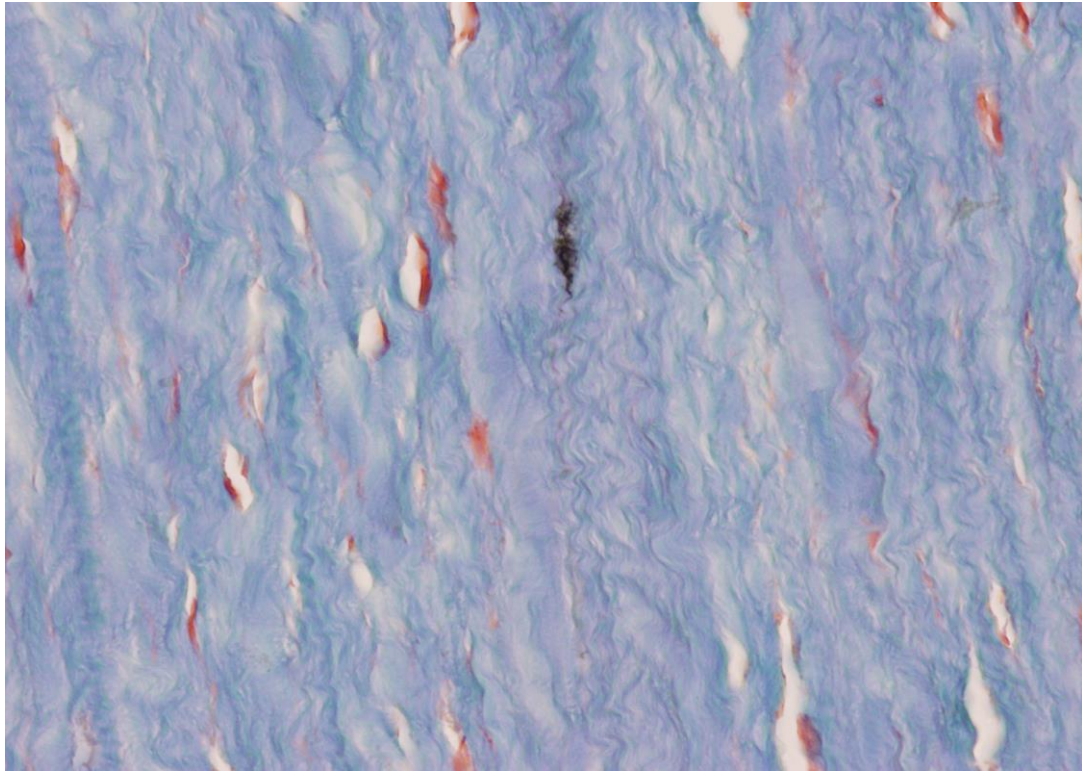


Figura 48: Tricrómico de Masson. Note la disposición ondulada de las fibras colágenas. Queratocitos activados y pigmento.



Figura 49: Tinción inmunohistoquímica con anticógeno I, el predominante en el estroma corneal.

6.3. Resultados histológicos. Análisis de cada color.

Se estudiaron la totalidad de las muestras procedentes de los globos oculares derecho e izquierdo de 14 conejos. En cada ojo se había realizado una micropigmentación intraestromal de la córnea periférica, la cual era ya evidente macroscópicamente, respetando en todos los casos el área pupilar.

Los pigmentos utilizados fueron los siguientes:

- Verde: muestras nº 1, 5, 7 y 13 (C2-OD, C4-OD, C8-OD y C11-2-OD).
- Pardo verdoso: muestras nº 2, 6 y 14 (C2-OI, C4-OI y C11-2-OI).
- Azul: muestras nº 4, 11, 15 y 17 (C3-OI, C10-1-OD, C12-3-OD y C13-4-OD).
- Variante azul: muestra nº 9 (C10-OD).
- Pardo azulado: muestras nº 3, 12, 16 y 18 (C3-OD, C10-1-OI, C12-3-OI y C13-4-OI).

El ojo C8-OI (nº 8) se había sometido a la cirugía pero no se le había inyectado pigmento alguno, es decir se considera un “pocket”. El ojo C10-OI (nº 10) estaba intacto (virgen) y era considerada como control. Por tanto estas muestras se utilizaron como controles del tratamiento.

Las **figuras 50 a 67** muestran las imágenes de algunos de los ojos tratados, en las cuales la figura “A” corresponde a la imagen macroscópica del globo ocular completo, la figura “B” es una imagen microscópica panorámica de una sección teñida con Hematoxilina-Eosina (obtenida por fusión de varias fotografías), mientras que las figuras “C” y “D” son imágenes microscópicas a mayores aumentos de secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina y/o con Tricrómico de Masson.

Las figuras 55, 57, 59, 63 y 67 muestran detalles de distintas muestras, según se detalla a continuación.

6.3.1 Grupo control

En este grupo se incluyen los ojos a los que no se les inyectó ningún pigmento (ejemplo muestra nº 10). Estos ojos que no recibieron ningún tratamiento, muestran normalidad tanto en el aspecto macroscópico (Fig. 50A) como en el microscópico (Figs. 50 B-C-D). No presentan ninguna alteración morfológica, mostrando normalidad estructural tanto en el epitelio anterior, como en el estroma y en el endotelio. Al observar esta muestra con luz polarizada se puede apreciar la disposición de las lamelas de colágeno, paralelas a la superficie corneal.

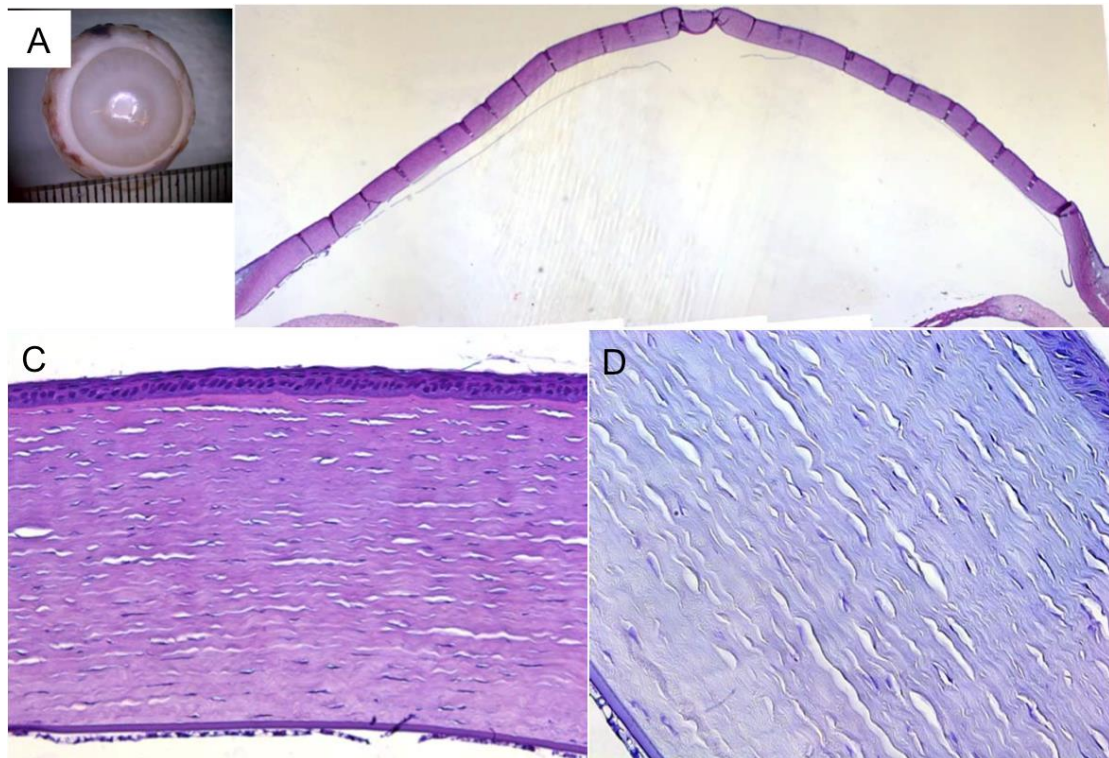


Figura 50. Muestra nº 10 (C10-OI), Ojo control sin cirugía ni pigmento. A: imagen macroscópica. B y C: Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina. D: Teñido con Tricrómico de Masson.

6.3.2 Grupo control “pocket”

Esta muestra nº 8 presenta un aspecto macroscópico normal, similar a la muestra control sin tratamiento (Fig. 51A). El estudio al microscopio revela que su

estructura coincide mayoritariamente con la muestra control (Fig. 51C). Sin embargo se han observado alteraciones puntuales en la disposición lamelar del colágeno en el estroma corneal, formándose unos pequeños “remolinos” de colágeno, es decir, zonas en las que las fibras de colágeno han perdido su disposición típica en capas paralelas (Figs. 51D). Esta misma disposición del colágeno en “remolinos” se ha observado también en algunas muestras de córneas micropigmentadas (véase más adelante), que en algunos casos llegaban a ser de gran tamaño, lo que sugiere que es un resultado de la propia cirugía.

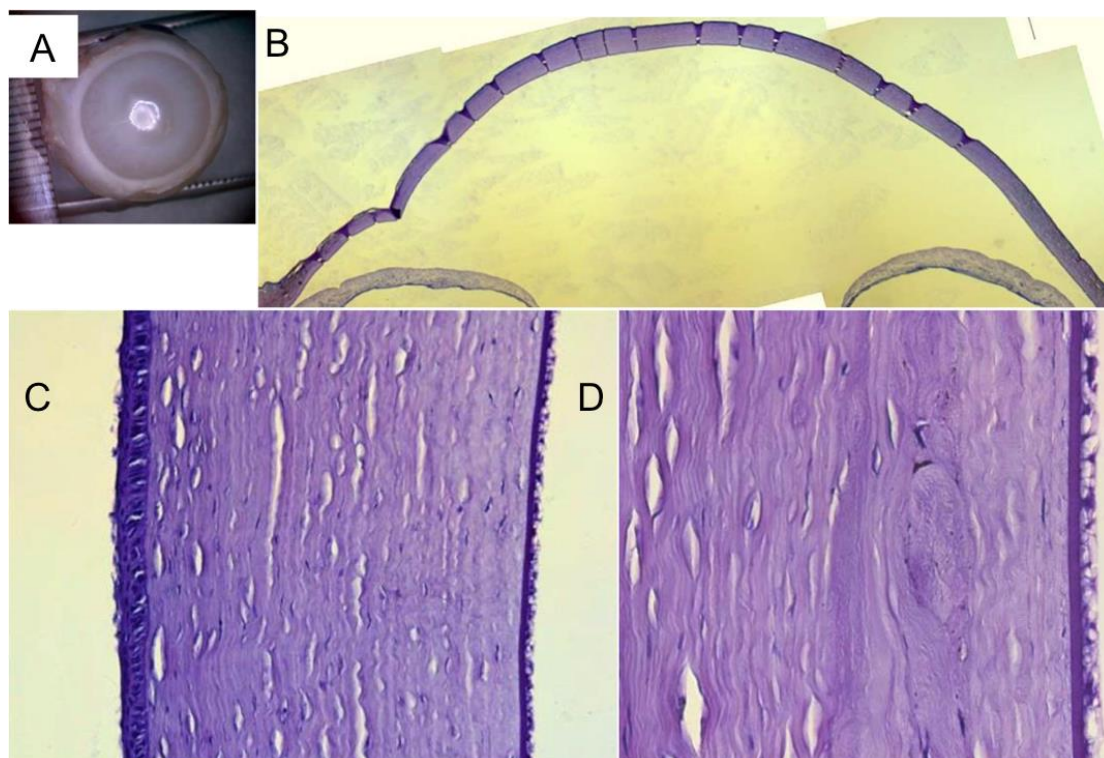


Figura 51. Muestra nº 8 (C8-OI), Ojo “pocket”. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B, C y D).

6.3.3 Grupos experimentales

En todas las muestras del grupo experimental se puede observar ya macroscópicamente que el pigmento introducido en el estroma corneal ocupa un anillo periférico, respetando el área pupilar en todos los casos.

El estudio microscópico revela que la pigmentación se observa como bandas discontinuas negruzcas, paralelas a la superficie corneal, de longitud y grosor variables, el cual parece estar localizado mayoritariamente entre las lamelas del colágeno estromal, y en ocasiones también parece observarse dicho pigmento en el interior de alguna célula propia del estroma, que puede localizarse a cierta distancia de la banda pigmentada, o como un pequeño punteado negro. Debido a la fuerte coloración negruzca del propio pigmento que se observa al microscopio, no resulta posible asegurar su localización intra o extracelular, aunque a nuestro criterio se localiza mayoritariamente extracelularmente, entre las fibras de colágeno, y puntualmente en el interior de alguna célula con aspecto de fibroblasto/queratocito propio del estroma, que en ocasiones presentan un tamaño aumentado.

Todos los pigmentos utilizados aparecen del mismo color negruzco al microscopio, independientemente del color utilizado para la micropigmentación intraestromal, y solamente en las muestras pigmentadas de azul o de pardo azulado se pueden observar pequeños precipitados azulados junto con los negruzcos (ver más adelante).

No se han observado células inflamatorias asociadas a la micropigmentación estromal, ni signos de neovascularización (ver más adelante).

6.3.4 Pigmento verde (muestras nº 1, 5, 7 y 13)

El estudio macroscópico de los ojos que recibieron la micropigmentación intraestromal de color verde revela que la pigmentación se distribuye de una manera regular. En las muestras nº 1 y 7 el pigmento adquiere un color verde parduzco (Figs. 52A y 54A), siendo muy intenso en la nº 1 y muy débil en la nº 7 (Figs. 55A-B); la muestra nº 5 presenta dos anillos coloreados parcialmente superpuestos, de color verde y pardo, de los cuales aparentemente la coloración parda se superpone a la verde (Fig. 53A); por último, la muestra nº 13 presenta una coloración verde intensa,

formando un anillo completo junto con una franja semicircular del mismo color superpuesta en un lateral (Fig. 55C).

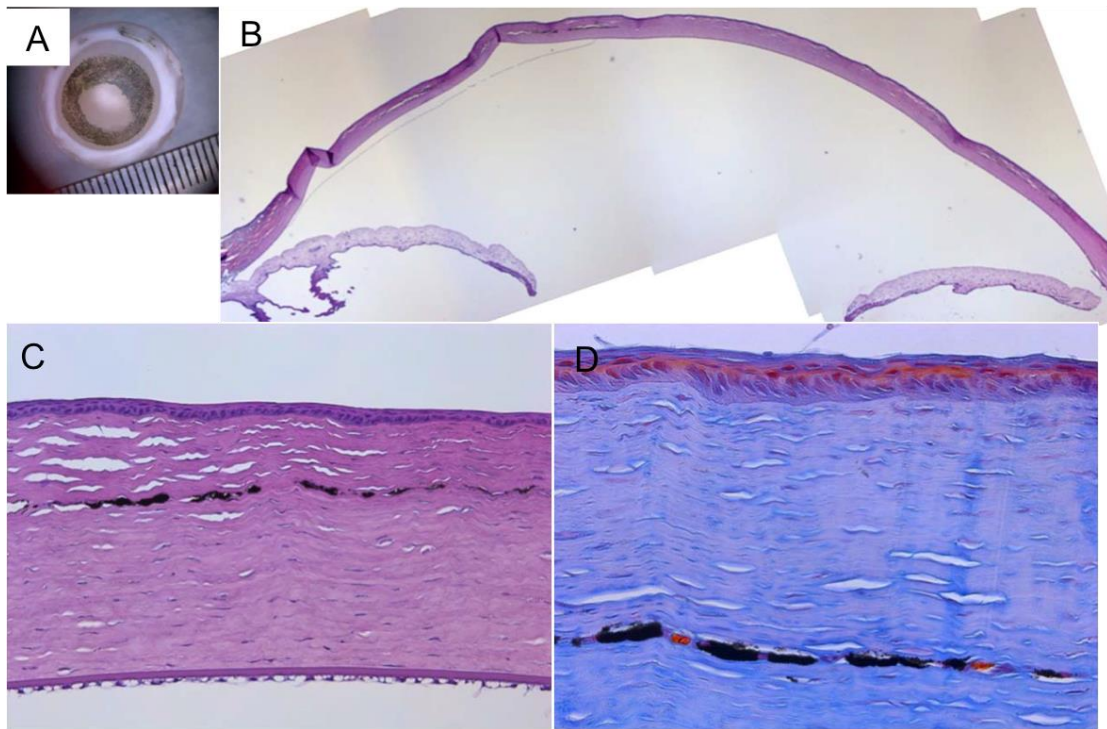


Figura 52. Muestra nº 1 (C2-OD), pigmento verde. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B y C) o con Tricrómico de Masson (D).

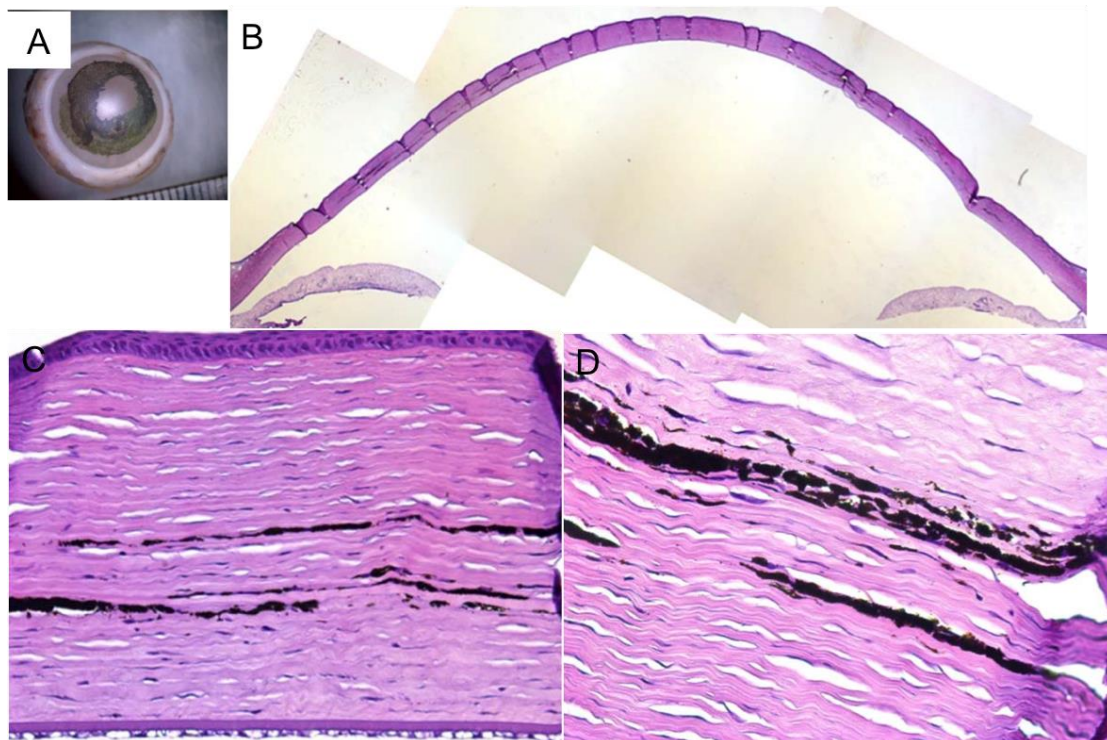


Figura 53. Muestra nº 5 (C4-OD), pigmento verde. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B, C y D).

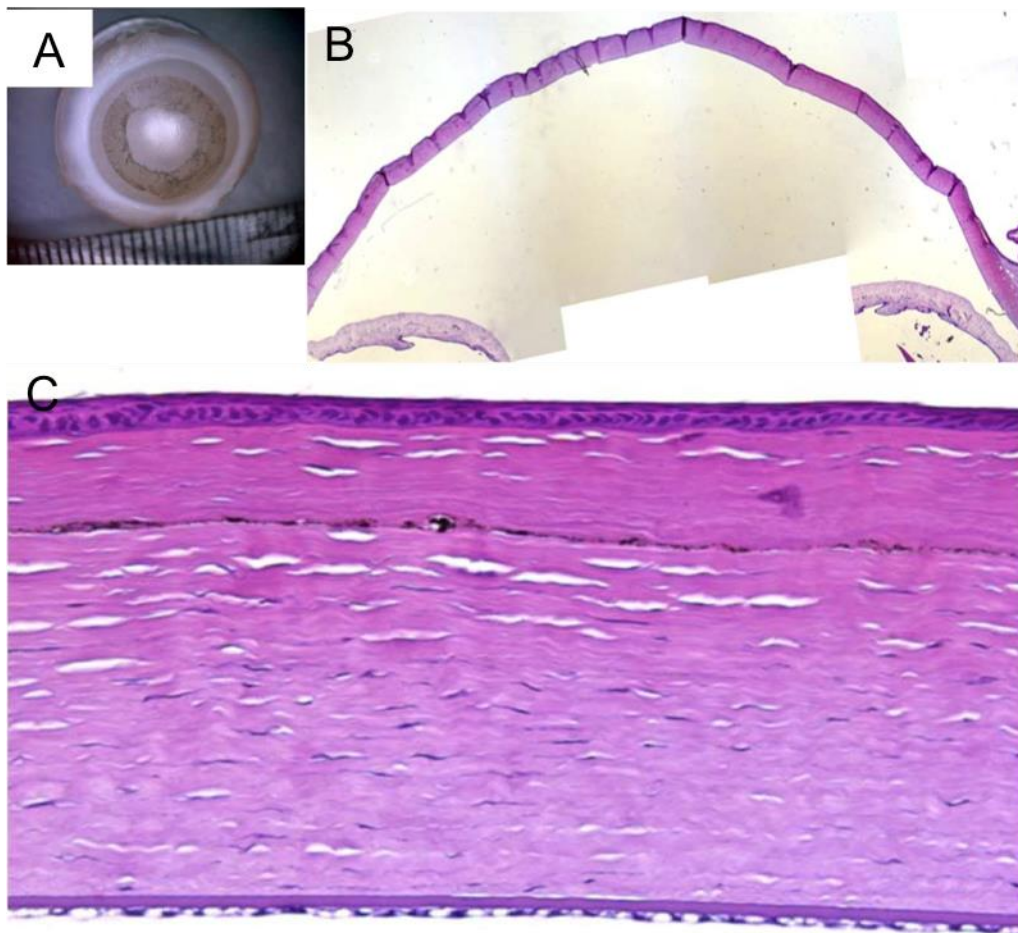


Figura 54. Muestra nº 7 (C8-OD), pigmento verde. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B y C).

El estudio microscópico revela que la localización del pigmento en el estroma corneal se dispone en una banda en las muestras nº 1 y 7 (Figs. 52C y 54C), mientras que en las nº 5 y 13 se observan dos bandas pigmentadas en algunas zonas de la córnea (Figs. 53C). La profundidad de dichas bandas es entre 25 y 50% del grosor corneal en todos los casos, excepto la banda profunda de la muestra nº 5 que es la banda más profunda observada entre todas las muestras estudiadas, localizándose en el 65% del grosor corneal (Figs. 53C). En todos los casos se observa alguna célula pigmentada localizada a cierta distancia de la banda principal (Figs. 53D y 55D).

Respecto a la ordenación del colágeno, se observan alteraciones puntuales en su disposición lamelar, apareciendo varios “remolinos” en las muestras nº 1 y 7 (uno de los cuales en la muestra nº 7 era de gran tamaño), los cuales pueden presentar

líneas irregulares y puntos de pigmentación en su interior (Figs. 54D).

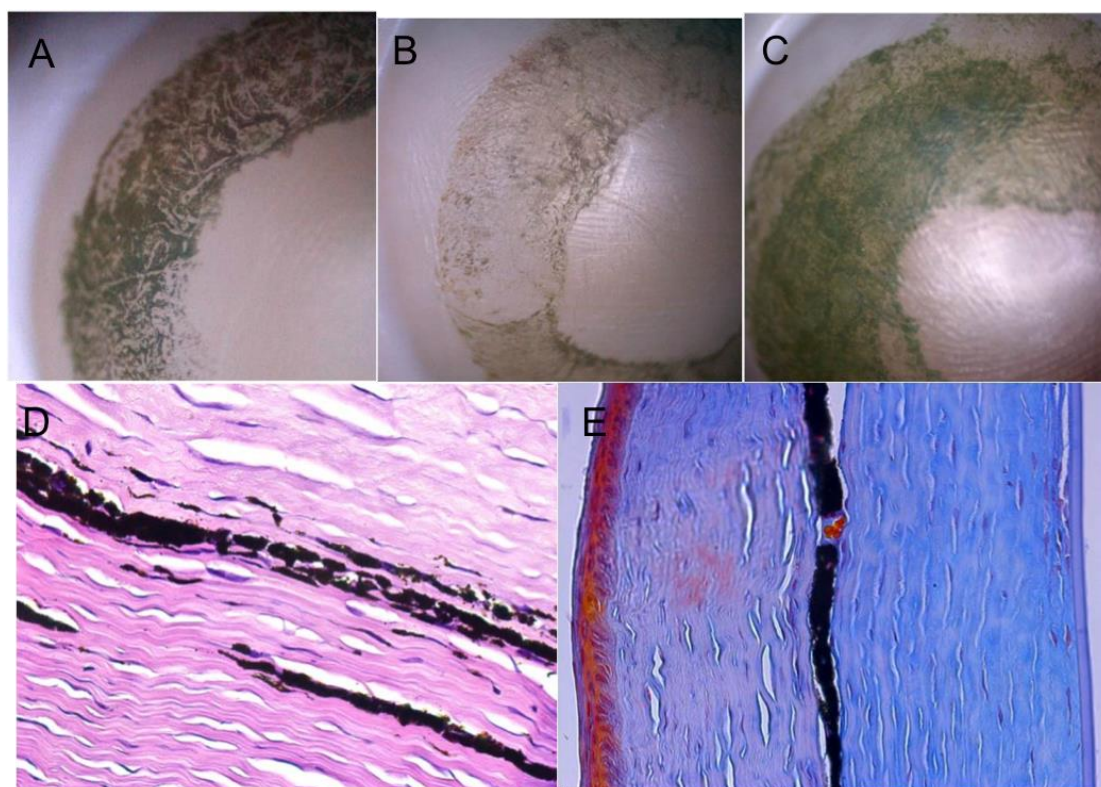


Figura 55. Córneas micropigmentadas de color verde. Imagen macroscópica de las muestras nº 1 (A), 7 (B) y 13 (C). Imágenes microscópicas, D: células pigmentadas localizadas a cierta distancia de la banda de pigmento (muestra nº 5). Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (D) o con Tricrómico de Masson (E).

6.3.4 Pigmento pardo verdoso (muestras nº 2, 6 y 14)

Macroscópicamente, los ojos micropigmentados de color pardo verdoso presentan una pigmentación distribuida de manera regular (Figs. 56A y 57A). En la muestra nº 6 la pigmentación se distribuye por todo el anillo corneal, aunque en un lateral parecía tener una banda periférica añadida (Fig. 57B). Por último, la muestra nº 14 presenta una coloración verde intenso y escasamente pardo, a diferencia de las otras muestras de este grupo, distribuyéndose el pigmento regularmente por todo el anillo corneal (Figs. 58A y 57C).

Microscópicamente se puede observar que el pigmento se localiza en una banda discontinua de grosor variable en las muestras nº 2 y 6 (localizada en el 20%

y entre el 25 y 50% del grosor corneal, Fig. 56C), mientras que en la muestra n°14 se observa una banda pigmentada localizada hacia el 20% del grosor corneal, y en determinadas áreas una segunda banda más profunda localizada entre en 25 y 50% del grosor corneal (Figs. 58C-D y 57D). Puntualmente se pueden observar pequeñas áreas pigmentadas aisladas, alejadas de la banda principal, que en algunas ocasiones está localizada a corta distancia del epitelio superficial (Fig. 57E), así como pequeños desdoblamientos de la banda pigmentada (Fig. 56D).

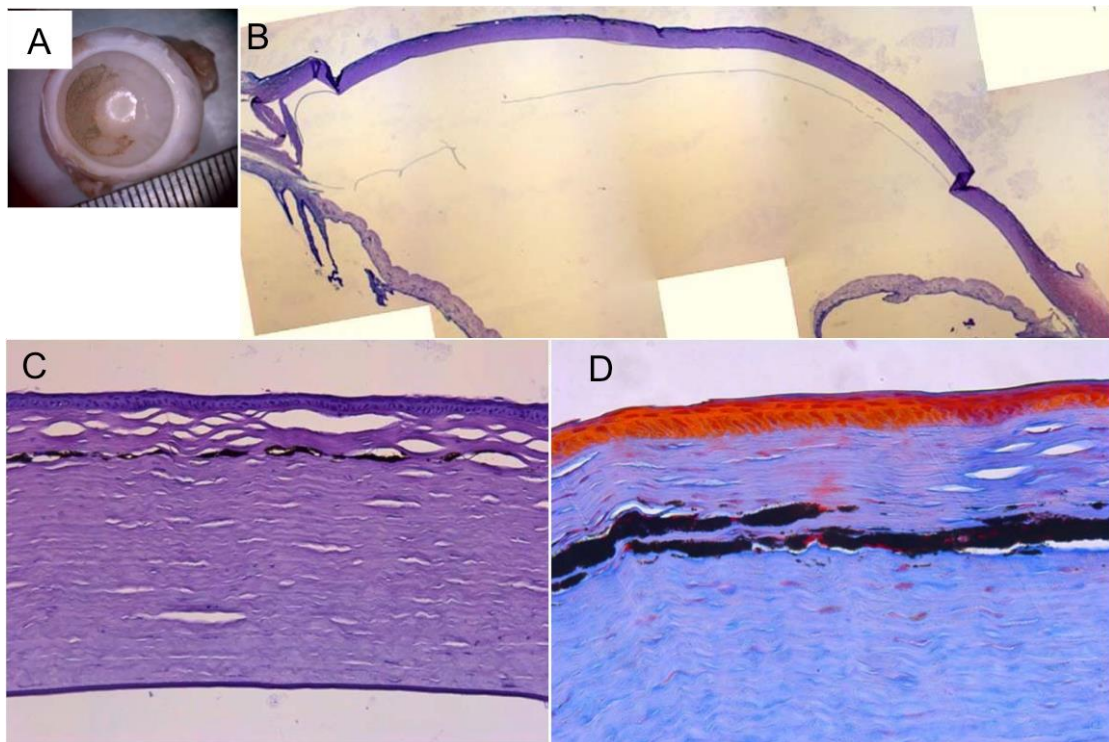


Figura 56. Muestra n° 2 (C2-OI), pigmento pardo verdoso. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B y C) o con Tricrómico de Masson (D).

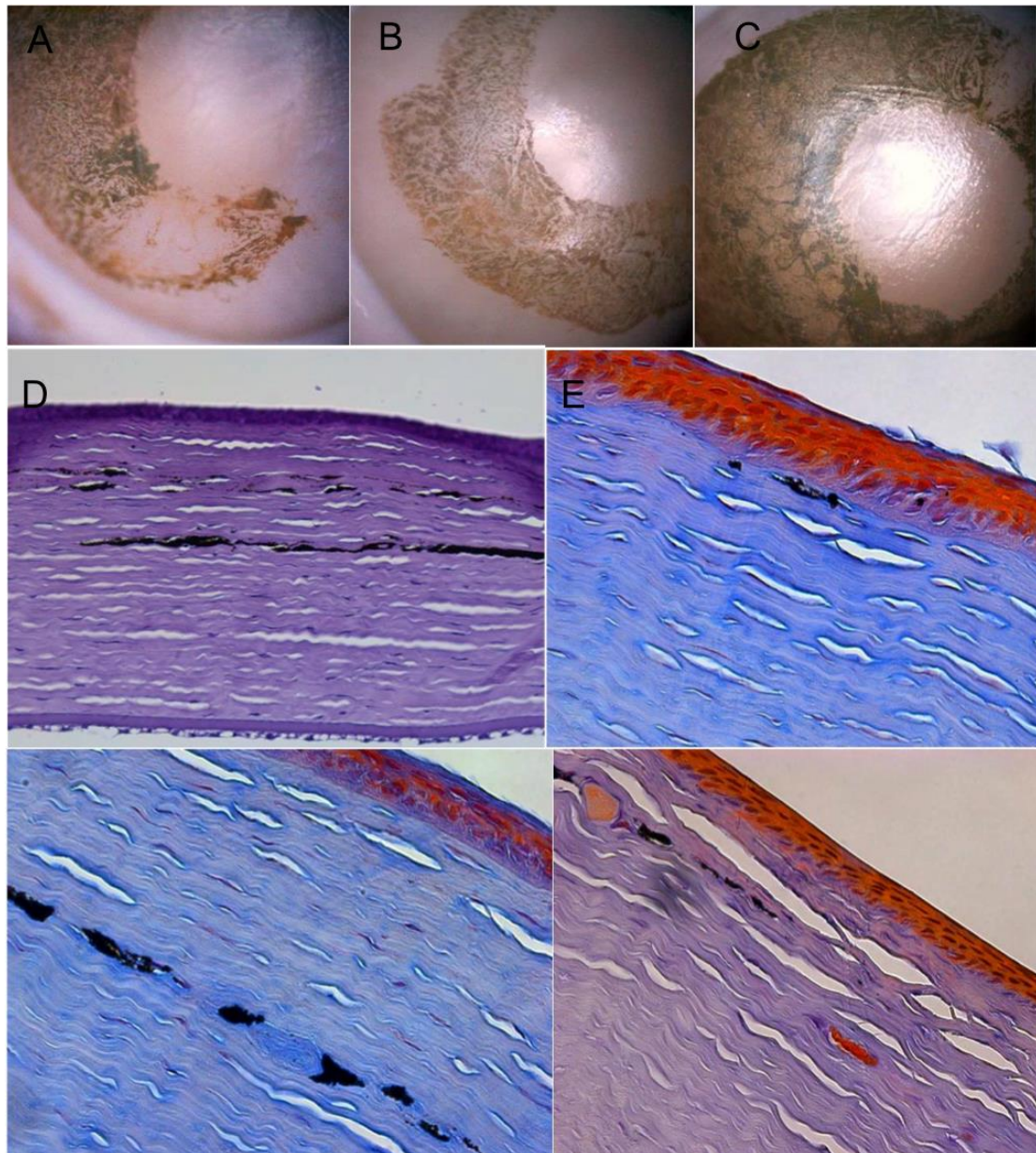


Figura 57. Córneas micropigmentadas de color pardo verdoso. Imagen macroscópica de las muestras nº 2 (A), 6 (B) y 14 (C). Imágenes microscópicas: D, doble banda pigmentada (muestra nº 14). E, pequeñas áreas pigmentadas aisladas localizada cercanas al epitelio anterior (muestra nº 2). F, alteración del patrón lamelar del colágeno (muestra nº 6). G, capilar (flecha) y precipitado amarillento en el seno de una banda de pigmento en la muestra nº 14. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (D) o con Tricrómico de Masson (E, F y G).

En estas muestras también se observan alteraciones puntuales en la disposición lamelar del colágeno, con la aparición de “remolinos” en las muestras nº 6 y 14 (Figs. 58D y 57F).

Finalmente, en la muestra nº 14 se observa la presencia de material amorfo

eosinófilo de pequeño tamaño, en el seno de una banda de pigmento, que se tiñe de color amarillento con Tricrómico de Masson (Fig. 57G).

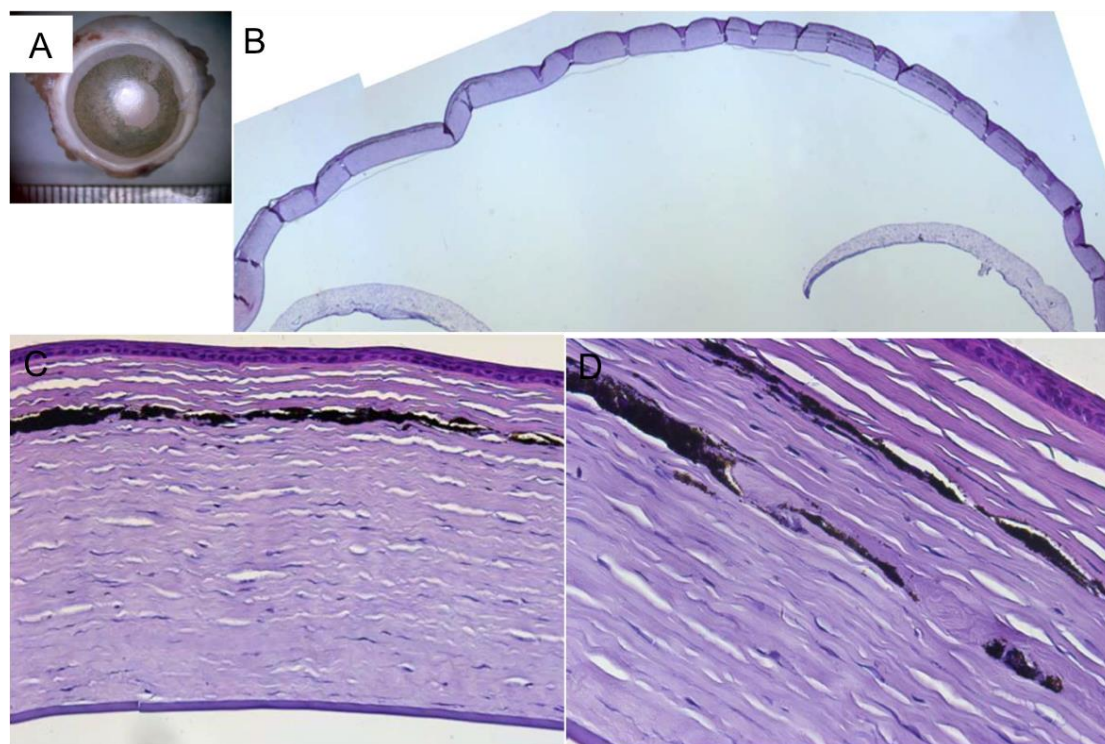


Figura 58. Muestra nº 14 (C11-2-OI), pigmento pardo verdoso. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B, C y D).

6.3.4 Pigmento azul (muestras nº 4, 9, 11, 15 y 17)

No se observan diferencias significativas en la morfología de la muestra nº 9 (pigmentada con el color variante azul) con respecto al resto del grupo (color azul), por lo que se consideraron todas estas muestras en un mismo grupo.

Todas las muestras de este grupo muestran macroscópicamente una pigmentación azul brillante que ocupa un anillo completo, respetando el área pupilar. Dicho pigmento se distribuye de manera irregular, de manera que en ocasiones se observan áreas pequeñas mientras que en otras son extensiones más amplias, dejando incluso áreas escasamente pigmentadas (Figs. 59A-B-C). En todas estas muestras aparece un punteado pequeño de color azul intenso, incluida la muestra

nº9 pigmentada con el color variante azul.

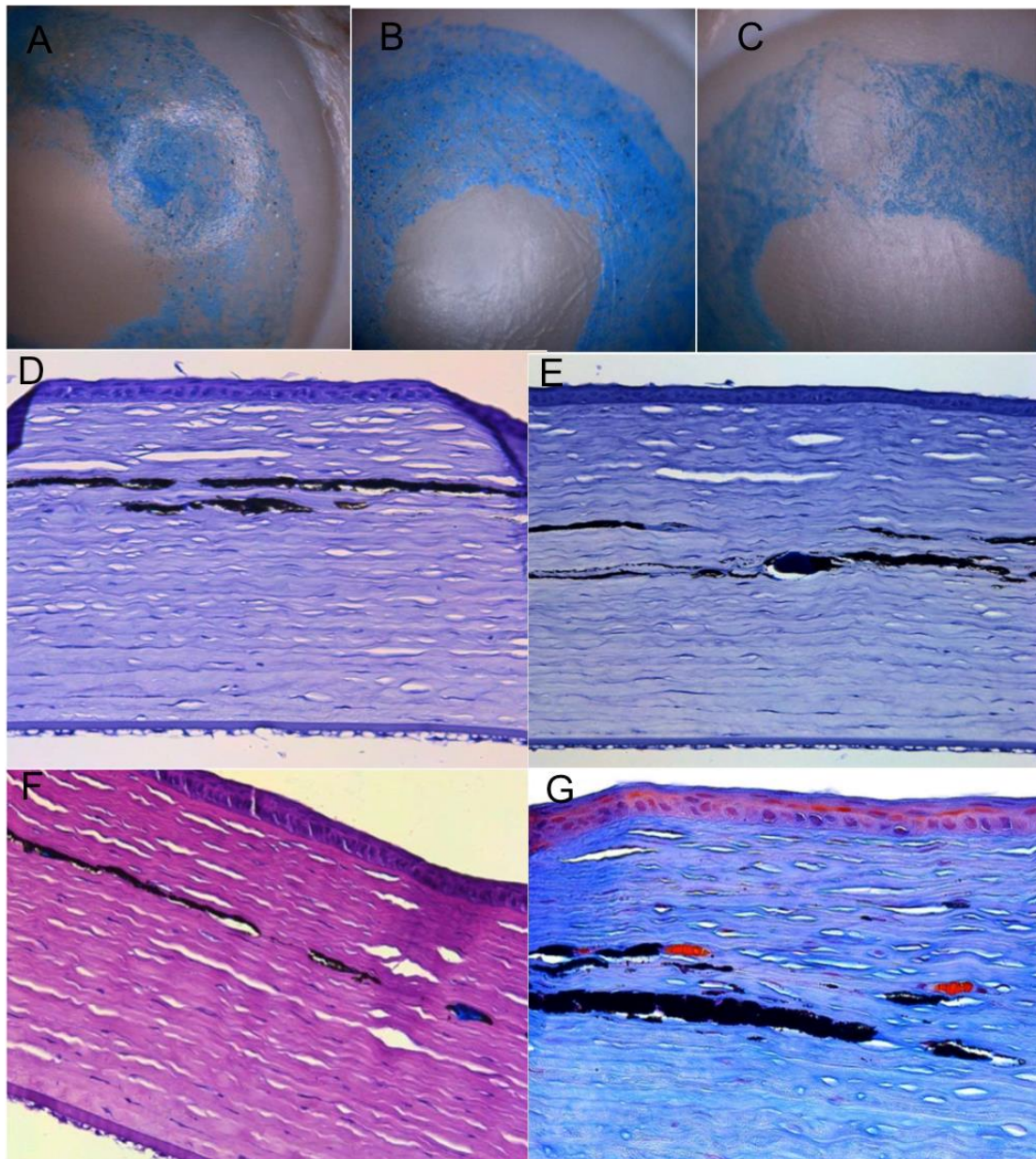


Figura 59. Córneas micropigmentadas de color azul. Imagen macroscópica de las muestras nº 4 (A), 17 (B) y 9 (C); obsérvese el punteado azul intenso que aparece en todas las muestras, junto con el pigmento azul brillante. Imágenes microscópicas: D y E, dobles bandas pigmentadas (muestras nº 9 y 15, respectivamente). F, precipitado azul intenso en el seno de una banda pigmentada (muestra nº 11). G, (muestra nº 15). Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (D, E y F) o con Tricrómico de Masson (G).

El estudio microscópico revela que el pigmento se localiza en una banda discontinua y de grosor variable en las muestras nº 4, 11 y 17 (localizada entre el 25 y el 50% del grosor corneal, Figs. 60C, 61C y 62C), mientras que en las muestra nº

9 y 15 se observa que, además de la banda de localización similar a la descrita anteriormente, en algunas zonas se observa una segunda banda pigmentada, localizada igualmente entre el 25 y el 50% en la muestra nº 9 (Fig. 59D), y entre el 50 y 75% en la nº 15 (Fig. 59E).

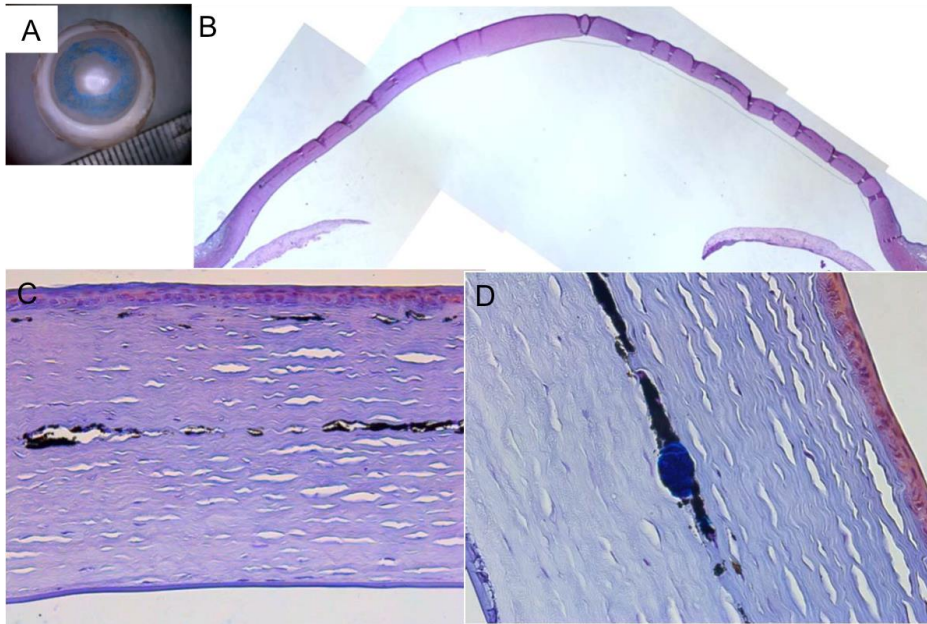


Figura 60. Muestra nº 4 (C3-OI), pigmento azul. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B) o con Tricrómico de Masson (C y D).

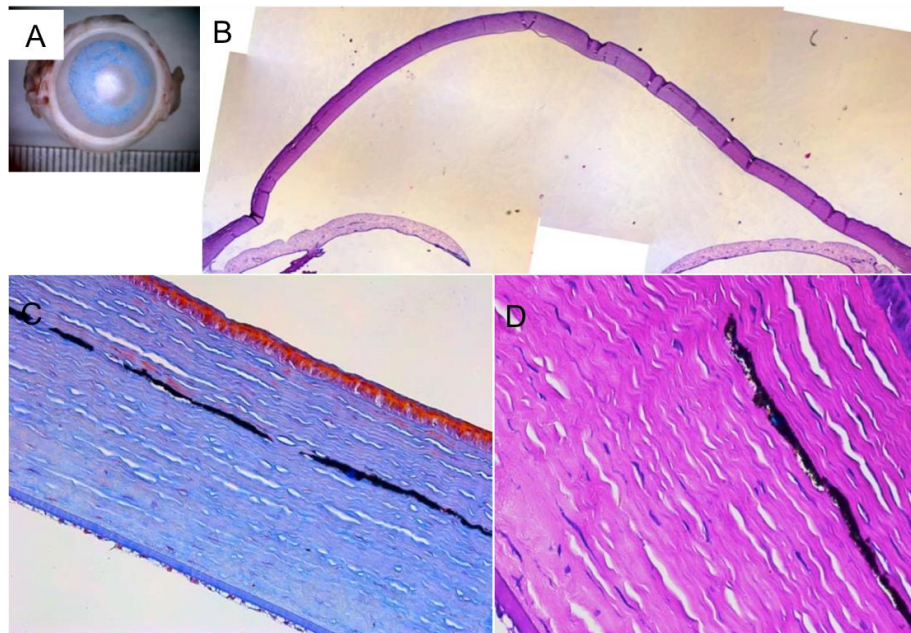


Figura 61. Muestra nº 11 (C10-1-OD), pigmento azul. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B y D) o con Tricrómico de Masson (C).

En todas estas muestras se observa un precipitado azul intenso de tamaño variable, localizado en el seno de las bandas pigmentadas (Figs. 60D, 61D, 62D y 59F). Como ocurría en algunos casos anteriores, en las muestras nº 9 y 15 se observa la aparición de pequeños “remolinos” de colágeno en el seno del estroma corneal que alteran su patrón lamelar.

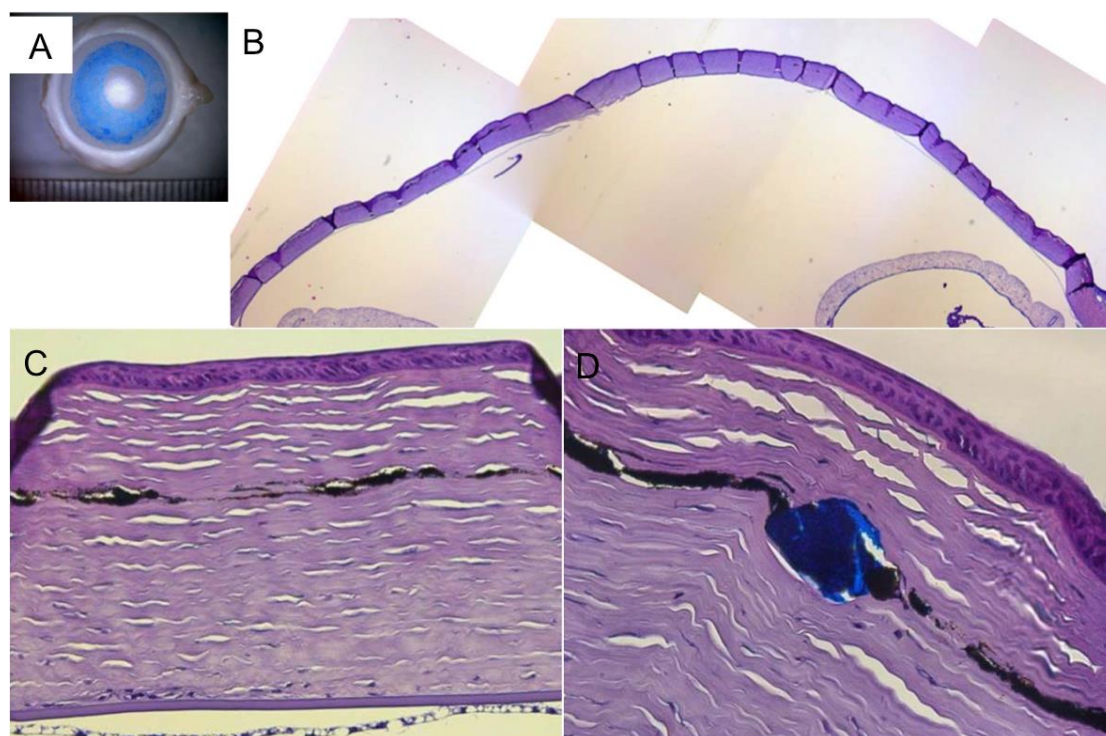


Figura 62. Muestra nº 17 (C13-4-OD), pigmento azul. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B, C y D).

6.3.4 Pigmento pardo azulado (muestras nº 3, 12, 16 y 18)

La observación macroscópica de estas muestras revela que las características tintoriales no son homogéneas en este grupo, ya que en la muestra nº 3 se pueden observar dos coloraciones diferentes entremezcladas (azul y pardo, Fig. 63A), mientras que en el resto del grupo la coloración era de un azul intenso más grisáceo (Figs. 63B-C). En todos los casos el pigmento se distribuye regularmente, con áreas grandes y pequeñas pigmentadas en la vecindad de otras escasamente

pigmentadas (Fig. 63B).

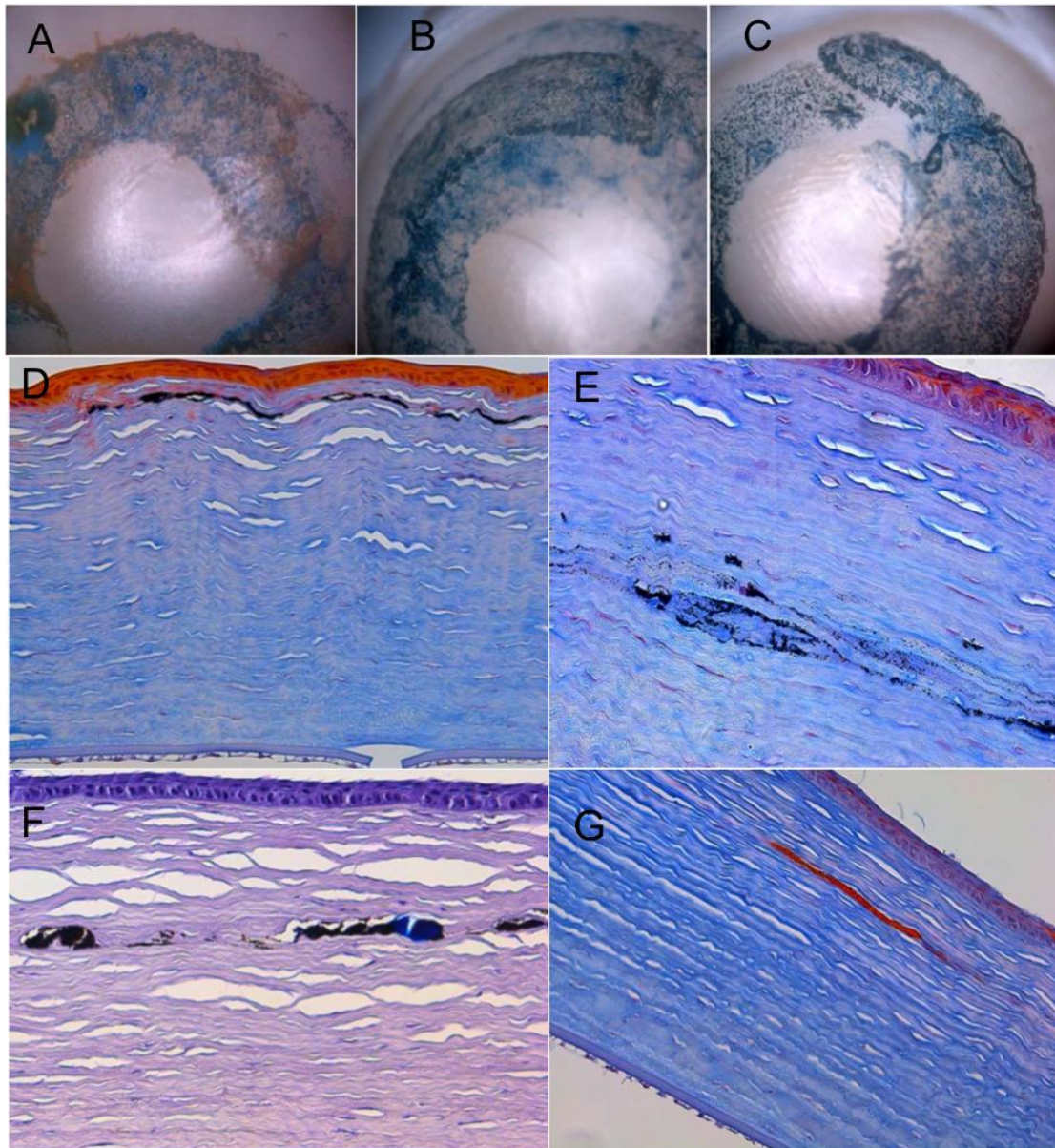


Figura 63. Córneas micropigmentadas de color pardo azulado. Imagen macroscópica de las muestras nº 3 (A), 18 (B) y 16 (C). Imágenes microscópicas: D, banda pigmentada cercana al epitelio (flecha, muestra nº 16). E, ligera dispersión del pigmento (flechas, muestras nº 18). F, precipitado azul intenso (flecha) en el seno de una banda pigmentada (muestra nº 12). G, (muestra nº 12). Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (F) o con Tricrómico de Masson (D, E y G).

En el estudio microscópico de estas córneas comprobamos que el pigmento se observa en una banda discontinua paralela a la superficie corneal, de grosor variable, localizada entre el 25 y 50% del grosor corneal (Figs. 64C, 65C y 66C); sin embargo, en algunas zonas de la muestra nº 16 la banda pigmentada está

localizada muy cercana al epitelio anterior, a una profundidad de sólo el 11% del grosor corneal (Fig. 63D), siendo esta banda la más cercana al epitelio de entre todas las muestras estudiadas. Como ocurría en otros grupos, se puede observar la presencia de grandes células de aspecto fibroblástico en el espesor de una banda de pigmento (Fig. 65D). De manera similar a lo que ocurre en las muestras pigmentadas con color azul, en todas las muestras de este grupo también se observa un precipitado azul intenso localizado en el seno de las bandas pigmentadas (Fig. 63F).

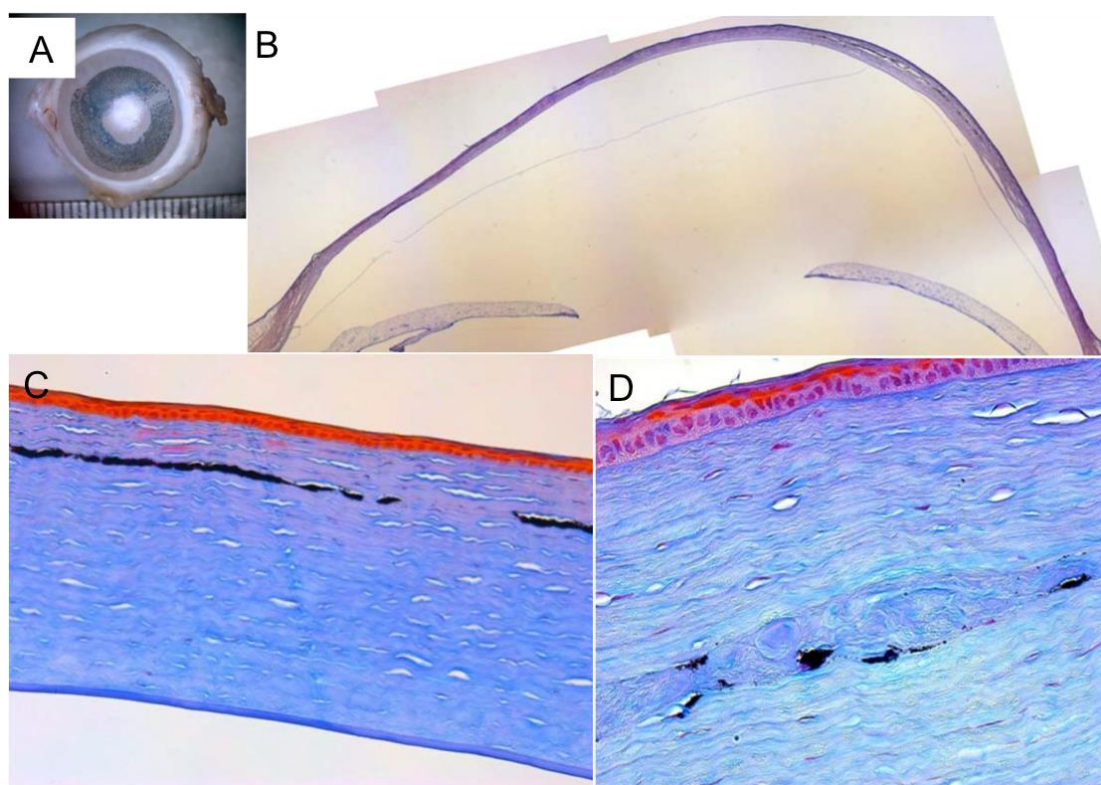


Figura 64. Muestra nº 12 (C10-1-OI), pigmento pardo azulado. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B) o con Tricrómico de Masson (C y D).

En el estroma de las muestras de este grupo también podemos observar la aparición de “remolinos” de colágeno, es decir, zonas que han perdido la disposición lamelar típica del colágeno estromal (Figs. 64D y 66D).

De manera similar a lo observado en la muestra nº 14 (Fig. 67G), la muestra nº 3 también presenta un precipitado teñido de amarillo.

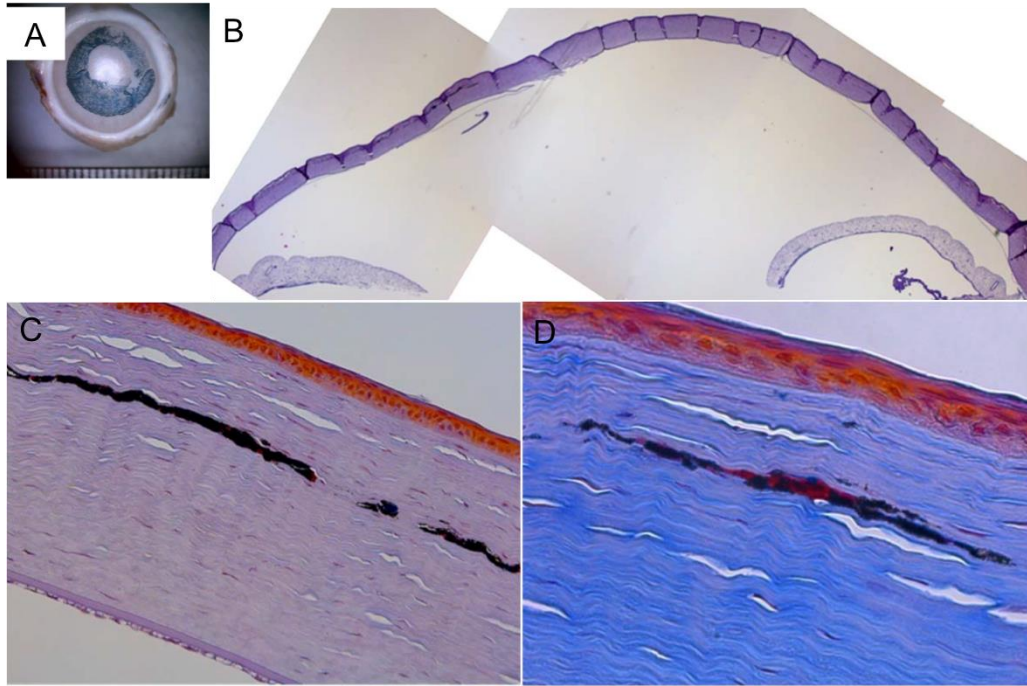


Figura 65. Muestra nº 16 (C12-3-OI), pigmento pardo azulado. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B) o con Tricrómico de Masson (C y D).

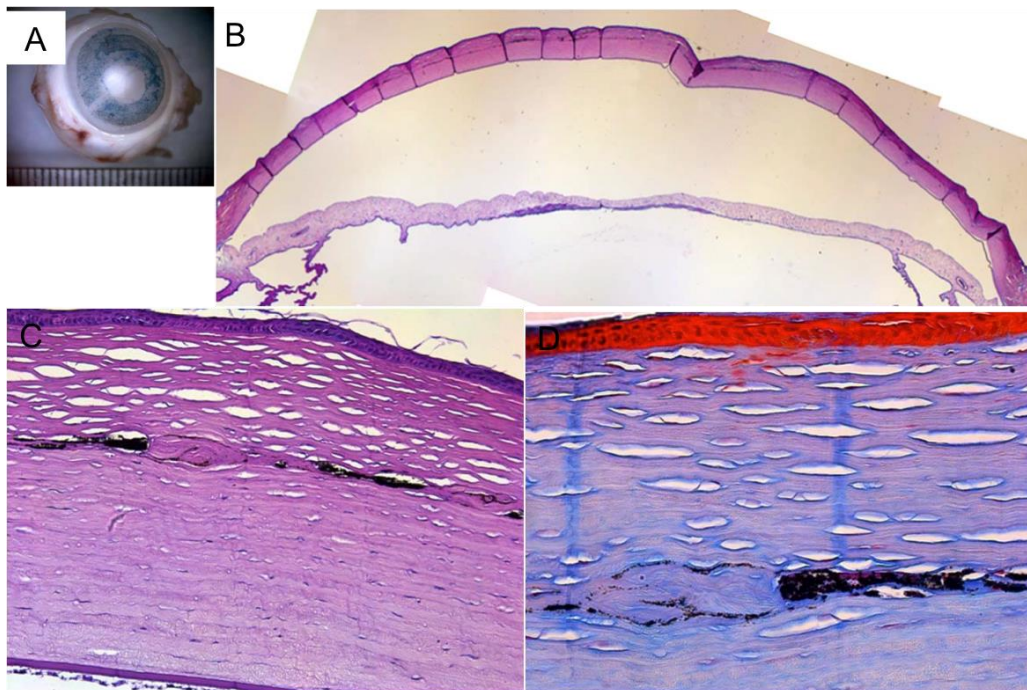


Figura 66. Muestra nº 18 (C13-4-OI), pigmento pardo azulado. A: imagen macroscópica. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (B y C) o con Tricrómico de Masson (D).

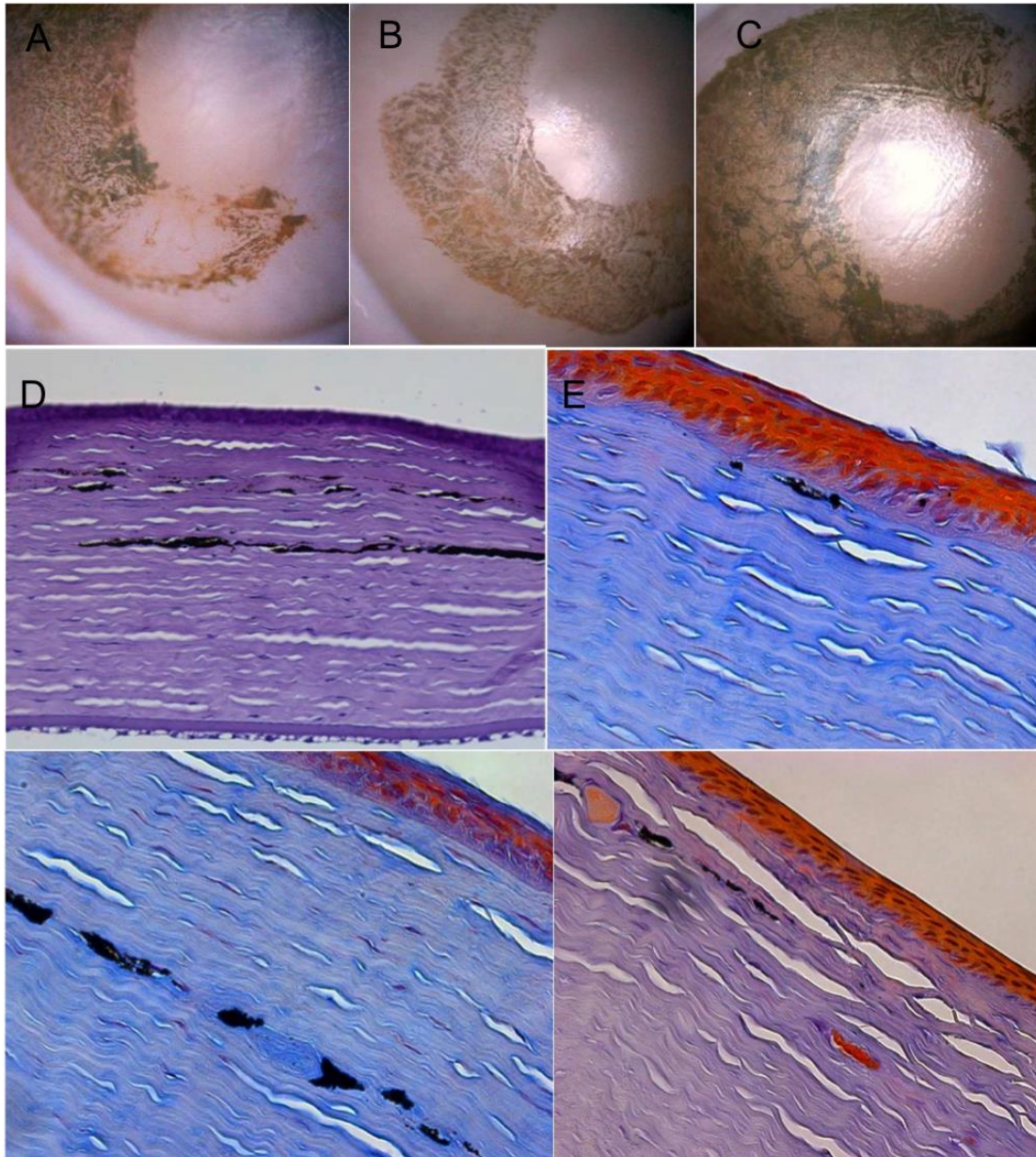


Figura 67. Córneas micropigmentadas de color pardo verdoso. Imagen macroscópica de las muestras nº 2 (A), 6 (B) y 14 (C). Imágenes microscópicas: D, doble banda pigmentada (muestra nº 14). E, pequeñas áreas pigmentadas aisladas localizada cercanas al epitelio anterior (muestra nº 2). F, alteración del patrón lamelar del colágeno (muestra nº 6). G, precipitado amarillento en el seno de una banda de pigmento en la muestra nº 14. Secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (D) o con Tricrómico de Masson (E, F y G).

6.4. Microscopia confocal

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 69 y 71).

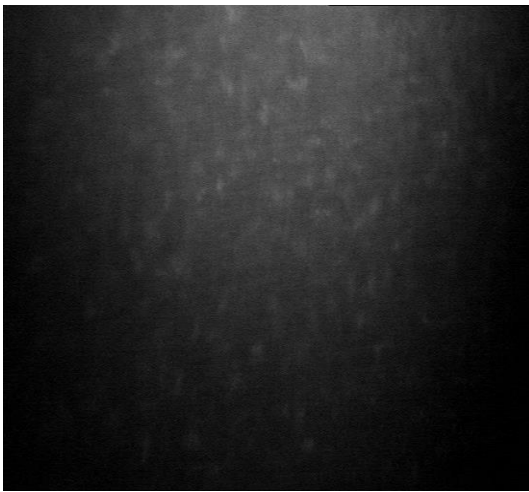


Figura 68: Estroma profundo con pigmento

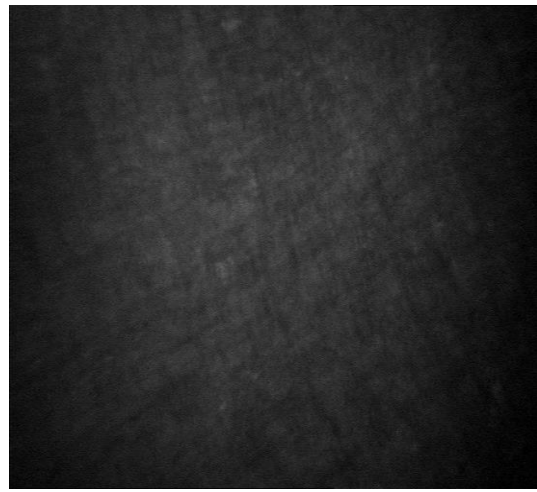


Figura 69: Estroma profundo en ojo control

El examen microscópico confocal de los ojos tatuados (Figura 68 y 70) 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 láminas estromales normales.

Aunque el estroma profundo subyacente justo por debajo del pigmento, no fue visible debido a la alta reflectividad del pigmento (Figura 72 y 75), 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 (Figura 73).

En dicha ecografía 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 68, 70, 72).

Las ecografías también mostraron una córnea superficial y profunda sin aumento de la actividad de los queratocitos. En los conejos con córnea sana (controles) la población de queratocitos fue de $143,6 \text{ células/mm}^2 \pm 17,32$. 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 vio alterada su morfología. En las córneas tatuadas no observamos células inflamatorias, ni cicatrices, ni reorganización de la matriz extracelular.



Figura 70: Estroma superficial con pigmento



Figura 71: Estroma superficial en ojo control

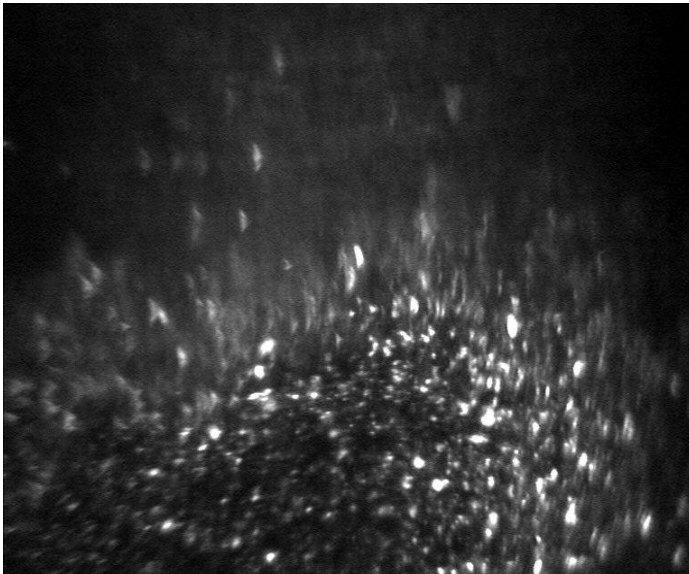


Figura 72: Estroma corneal medio con pigmento (visto mediante una alta reflectividad de la luz)

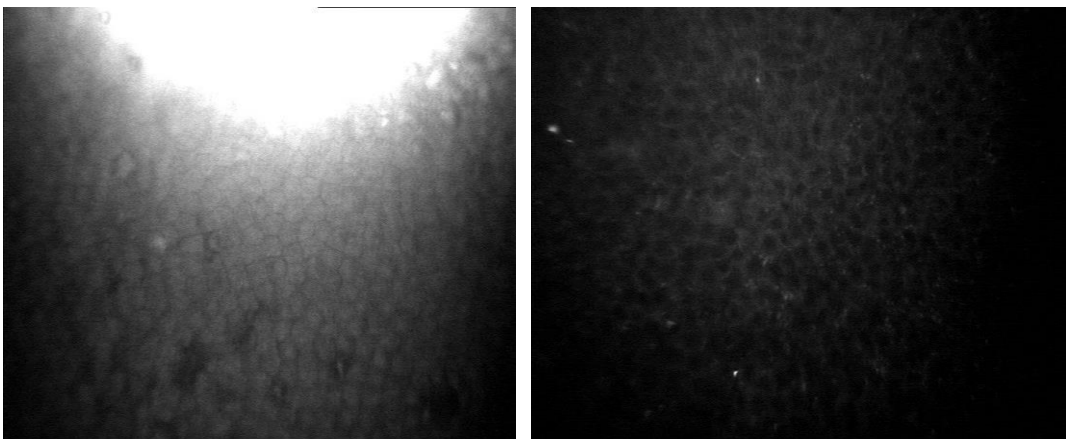


Figura 73: Endotelio corneal (alta reflectividad del pigmento en el estroma medio), Figura 74: Epitelio corneal en ojo tatuado.

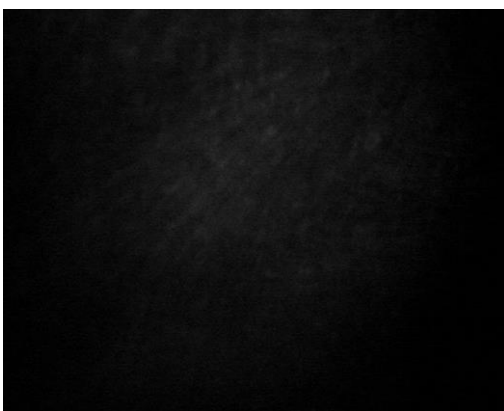


Figura 75: Estroma anterior en ojo tatuado

6.5. Resultados inmunológicos

Como ha sido explicado anteriormente en el apartado de materiales y métodos, el pigmento utilizado en el presente trabajo fue sometido a una evaluación in vitro por medio del test de inflamación en células mononucleares humanas de sangre periférica (PMBCs), con el objetivo de observar la respuesta inflamatoria de dichas células a los diferentes pigmentos por medio de cultivo.

La estrategia consistía en aislar PMBCs humanas procedentes de Buffy coats (capa leucocitaria), exponerlas toda la noche durante 16 horas a los pigmentos negro (utilizado como control) y a una mezcla de los pigmentos coloreados (problema). Posteriormente se procedía a recoger el sobrenadante y analizar las citoquinas producidas por dichas células.

El protocolo utilizado fue explicado en el apartado anterior:

- Aislamiento de PMBCs a partir de buffy Coat por gradientes de Ficoll.
- Dilución de los pigmentos por saturación en medio BSS (solución stock).
 - Mezcla control: 1ml BSS + 175ul Stock negro (control)
 - Mezcla problema: 1ml BSS + 50ul Blanco + 50ul Marron + 25ul Azul + 50ul Verde (problema)
- Incubación de 40ul de las mezclas control y problema en 1ml de RPMI con 3×10^6 PMBCs durante 16 horas.
- Análisis de las citoquinas del sobrenadante por BD™ Cytometric Bead Array (CBA).

Los resultados obtenidos se explican en los siguientes gráficos (Gráfico 1). En ellos se puede deducir que el pigmento control (negro) genera más producción de citoquinas inflamatorias que el pigmento problema (colores). Como el pigmento control no originó reacción inflamatoria in vivo, es de esperar que la mezcla de los colores problema no lo origine tampoco in vivo.

Por lo tanto la reacción inflamatoria observada en algunos de los conejos ha de deberse en consecuencia a la técnica quirúrgica.

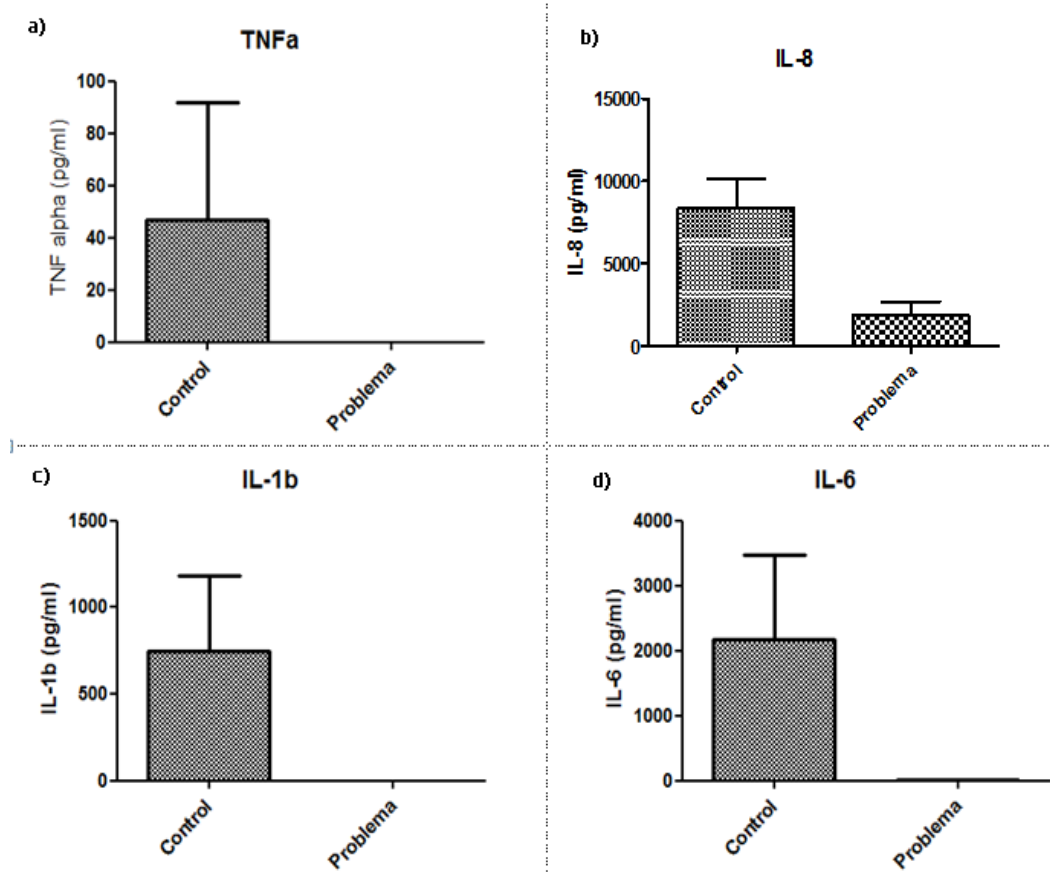


Gráfico 1: Perfil de citoquinas inflamatorias en pigmentos control y problema. N=3.

6.5.1 Inmunomarcaje del Antígeno Leucocitario Común

Las muestras histológicas fueron sometidas a otro análisis inmunológico, valorando el anticuerpo monoclonal anti-Antígeno Leucocitario Común, ya que éste pone en evidencia la presencia de leucocitos y por tanto podría indicar presencia de células inflamatorias en las córneas tratadas.

Esta prueba resultó ser negativa en todas las muestras, por lo que podemos concluir que las mezclas de pigmentos minerales micronizados utilizados no despertaron ninguna reacción inflamatoria en las córneas receptoras (Figura 76A).

También se utilizó para dicha prueba un control positivo, que en este caso se

trataba de la médula ósea de los conejos, en las cuales sí se detectaron células inmunorreactivas como cabría esperar (Figura 76B).

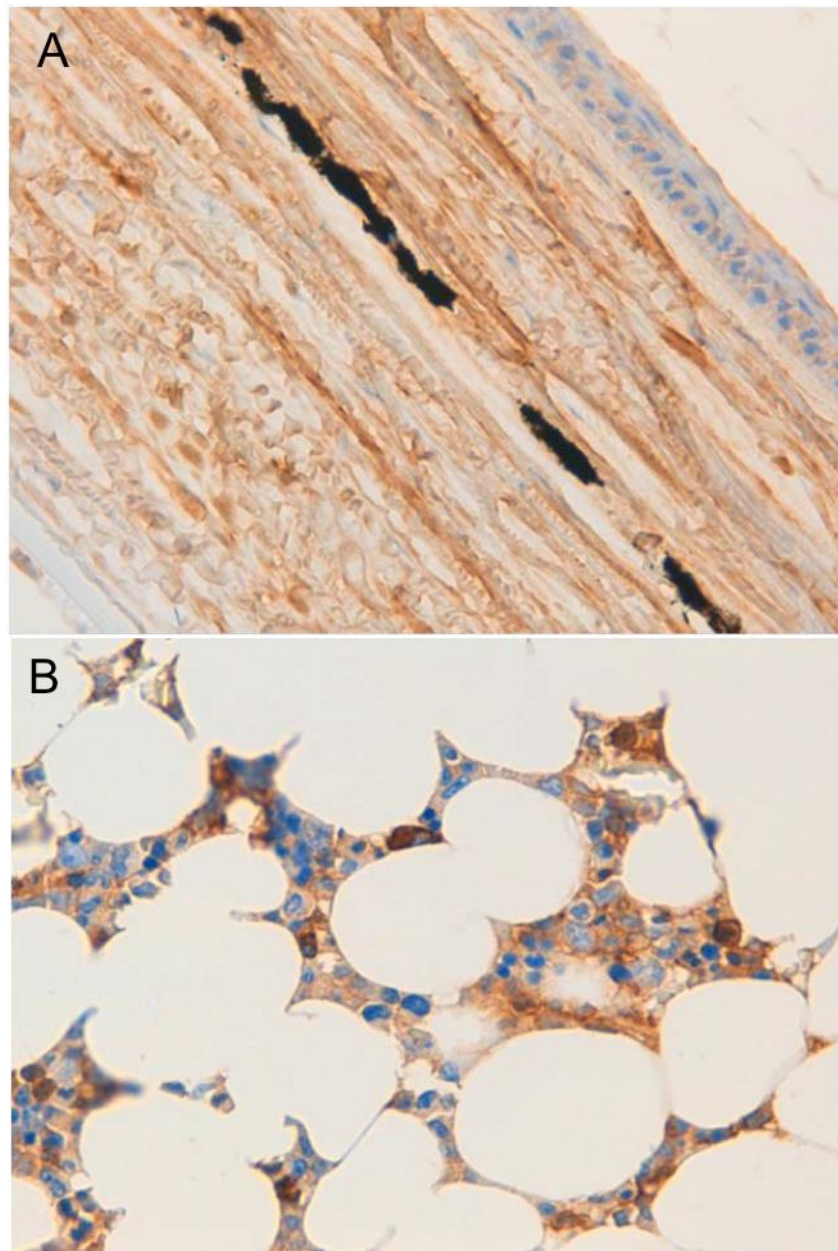


Figura 76. Inmunomarcaje del Antígeno Leucocitario Común. A: muestra histológica de córnea tratada con pigmentos en la que no se observa inmunotinción específica; B: médula ósea de conejo mostrando células inmunorreactivas.

Estos dos estudios inmunológicos apoyan la teoría de que los pigmentos utilizados no generan inflamación y/o neovascularización en los ojos tratados.

6.6. Resultados morfométricos

Para el análisis morfométrico se midieron los grosores de todas las córneas tratadas y se determinó el valor medio de cada grupo. Aunque había ligeras diferencias en el grosor entre una muestra y otra, no se apreciaron diferencias significativas.

Los grosores medios corneales en los diferentes grupos fueron los que se muestran a continuación:

Grupo control, grosor corneal medio de 360 μm

Grupo "pocket", grosor corneal medio de 357 μm

Grupo color verde, grosor corneal medio de 352 μm

Grupo color pardo verdoso, grosor corneal medio de 347 μm

Grupo color azul, grosor corneal medio de 364 μm

Grupo color pardo azulado, grosor corneal medio de 342 μm

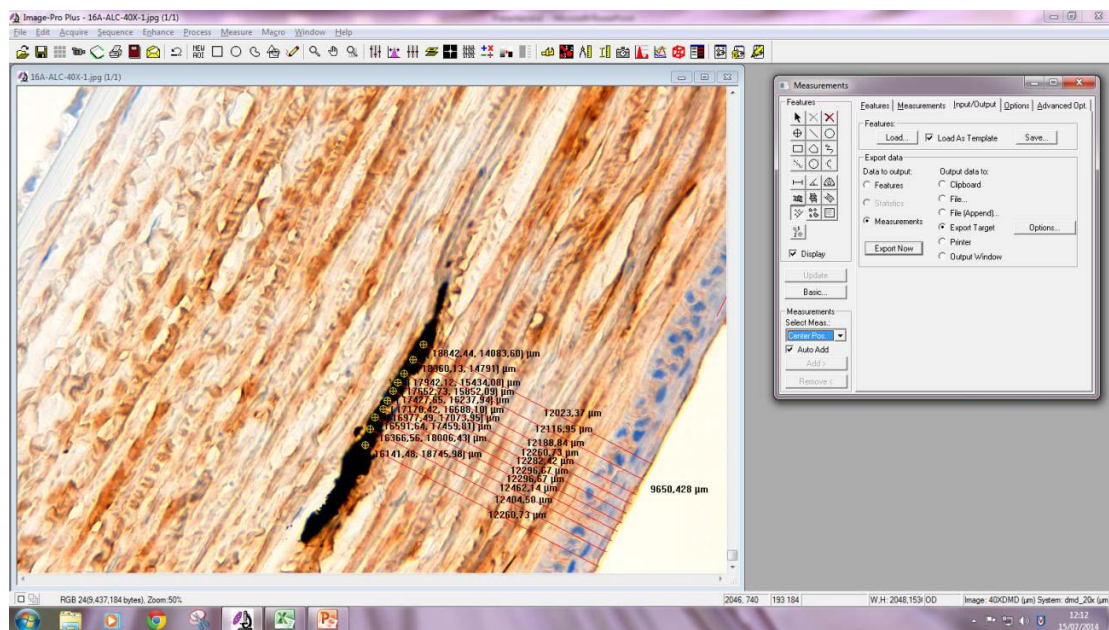


Figura 77. Análisis morfométrico

Además, de la paquimetría media de cada grupo tratado, el análisis morfométrico se realizó para determinar la ubicación del pigmento tanto en relación al grosor de toda la córnea como en relación al grosor del estroma, expresado en

porcentaje. Para ello se utilizó el programa de análisis de imagen Image ProPlus 7.0 de Media Cybernetics. Se siguió el siguiente procedimiento:

- Se realizaron fotografías con aumento 40x a dos campos de todas las muestras, con el microscopio DMD108 de la casa Leica.
- Posteriormente se procedió a la calibración de las imágenes.
- Y se realizaron 10 medidas seriadas del grosor de:
 - Córnea
 - Epitelio anterior
 - Estroma
 - Profundidad del pigmento con respecto al epitelio anterior de la córnea
 - Profundida del pigmento con respecto al estroma anterior
- Se obtuvo la media de todas las medidas en los dos campos.
- Se apuntaron los datos en porcentajes.

Se adjunta una imagen representativa en la Figura 77, de las medidas de la profundidad del pigmento en una de las muestras estudiadas.

6.7. Método de simulación y catálogo de colores

Para poder predecir el resultado cosmético de los pacientes que puedan ser sometidos a esta técnica de queratopigmentación en un futuro, se ha creado un modelo de simulación utilizando los resultados clínicos (fotografías) de las mezclas de colores empleados en la experimentación animal. De esta forma se ha creado un catálogo de colores con las diferentes mezclas conseguidas, superponiendo los colores obtenidos a la imagen de una modelo de ojos oscuros.

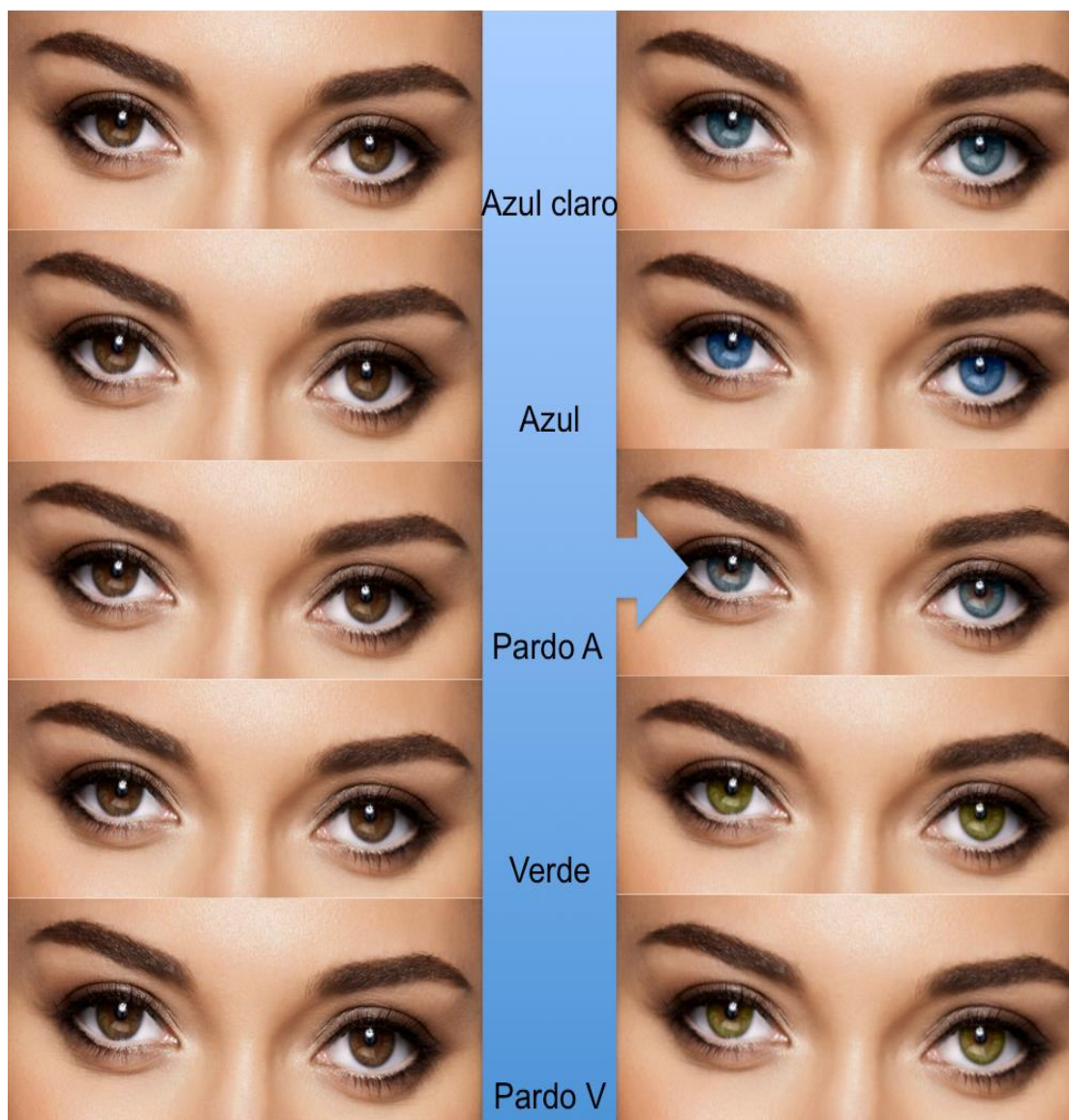


Figura 78: Modelo de simulación con programa Adobe Photoshop.

Para la superposición de imágenes se utilizó el programa informático Adobe Photoshop CS6. El método utilizado fue el siguiente:

Se aclara el color del iris original de la modelo (de pardo oscuro a pardo claro), luego se crea una capa de color sólido para simular el área pupilar, aplicando posteriormente un efecto de transparencia de color llamado "color"; con esto se consigue que la pupila original adopte el color de la nueva capa. Luego se utiliza el color obtenido en las fotografías de los conejos pigmentados para rellenar el área que corresponde al iris. De esta forma se puede simular el color final deseado, partiendo como base de una foto de la persona que se quiera someter a esta técnica.

Todo este procedimiento se realizó con la ayuda de un diseñador gráfico especialista en el manejo del Photoshop. Este método permite predecir el resultado final de cualquier iris tras la queratopigmentación con un color determinado.

Se adjuntas fotografías (figura 78) para demostrar la simulación realizada, partiendo de modelo con iris color marrón y superponiendo las mezclas de colores utilizados: azul claro, azul, pardo azulado, verde y pardo verdoso.

7. DISCUSION

El tatuaje corneal o queratopigmentación es un procedimiento útil en grupos seleccionados de pacientes, tanto para indicaciones cosméticas como terapéuticas.^(Pitz 2002) No se trata de una técnica reciente o nueva para tratar una córnea cosméticamente alterada, ya que en realidad fue desarrollada hace muchos siglos. Sin embargo tras varias décadas, el procedimiento dejó de ser popular y no obtuvo el reconocimiento de muchos cirujanos oftalmólogos. Actualmente, la técnica de queratopigmentación ha comenzado nuevamente a popularizarse y ha llamado la atención de muchos cirujanos como una buena alternativa para proporcionar un resultado satisfactorio para los trastornos corneales cosméticamente y psicológicamente incapacitantes para un cierto grupo de pacientes. Creemos que en un futuro próximo dicha técnica ocupará un lugar importante en la práctica quirúrgica, ya que la sociedad cada día demanda resultados tanto visuales como cosméticos que se aproximen cada vez más a la perfección.

Actualmente, la queratopigmentación se ha vuelto a poner en práctica con una amplia variedad de indicaciones, no sólo con motivos terapéuticos sino también como modalidad cosmética, que tiene sus propias indicaciones en pacientes con buen potencial visual.

Uno de los aspectos fundamentales que amplía el abanico de indicaciones de la queratopigmentación es que hoy día disponemos de equipos mucho más avanzados que aseguran un resultado cosmético excelente con mínimos riesgos intraoperatorios y postoperatorios. Entre dichos equipos tenemos por ejemplo, la tecnología láser de femtosegundo, que permitiría la realización de túneles intraestromales con menor riesgo de complicaciones, o el instrumental quirúrgico avanzado, como los cuchilletos de diamantes, que hacen posible mejorar los métodos de queratopigmentación e idear nuevas técnicas de tatuaje quirúrgico. Este

aspecto puede otorgar al procedimiento la capacidad y las motivaciones para que recupere su popularidad.

La queratopigmentación ya ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de cicatrices corneales cosméticamente desfigurantes, de leucomas o leucocoria siendo una alternativa terapéutica valiosa y razonable.^{(Pitz 2002) (Alió 2010)} Burris et al,^(Burris 1998) 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 diplopias monoculares y fotofobia^(Pitz 2002) ^(Alió 2011a, 2011b, 2012) en pacientes con iridectomías importantes o pérdida traumática del iris.^{(Pitz 2002) (Alió 2011b)} 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.^{(Pitz 2002) (Alió 2010, 2011a, 2011b)}

También hay que puntualizar la gran dificultad que supone para algunos pacientes la utilización de lentes de contacto cosméticas impresas o teñidas, blandas o rígidas, lo que en ocasiones causa intolerancia y hace que el paciente busque soluciones alternativas y esté dispuesto a someterse a una intervención quirúrgica. Y más allá de la actitud renuente del paciente a someterse a cirugías como la evisceración y la enucleación, con sus efectos psicológicos y sociales, también están las complicaciones bien conocidas de las queratoplastias, entre las cuales encontramos el rechazo,^(Sekundo 1999) el fallo del injerto,^(Hollick 2006) alto riesgo de infecciones, la necesidad de tratamiento tópico esteroideo prolongado, entre otros. De manera que el procedimiento de queratopigmentación sigue siendo una técnica segura con pocas complicaciones, que se puede realizar con mínimos riesgos. En los casos de traumatismo mecánico grave (aniridias traumáticas), incluidas lesiones térmicas y químicas resulta igualmente muy beneficioso, ofreciendo resultados seguros y satisfactorios con efectos a corto y a largo plazo.

Un aspecto importante a considerar es la integridad de la membrana basal, ya que ésta 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 difícil de tratar y dolorosa.^(Panda 1984) 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.^(Panda 1984) La membrana basal corneal actúa como un andamio para reemplazar ordenadamente la célula epitelial, y cualquier anomalía traumática de la membrana basal podría dar lugar a trastornos erosivos recurrente.

En un artículo recientemente publicado sobre una complicación de la queratopigmentación, los autores describieron un caso de ablandamiento corneal tras la aplicación de cloruro de platino. Dicho ablandamiento era aproximadamente el 70% del grosor del estroma corneal, con un defecto subyacente del epitelio corneal. Las posibles explicaciones son las siguientes: primero – una escasa adherencia del epitelio a las zonas en las que se aplica el material del tatuaje, 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,^(Fini 1991, Fini 1992, Macartney 1983) con el posterior ablandamiento del estroma. Dichas complicaciones constituirían una desventaja de la antigua técnica de queratopigmentación, en la que se eliminaba el epitelio y se impregnaba el estroma con pigmento, maniobra que, en sí misma, puede resultar traumática.

En todos nuestros ojos tratados, no observamos este tipo de complicaciones. Por lo tanto se puede interpretar que dicha complicación de ablandamiento del estroma, está relacionada con la antigua técnica de impregnación del pigmento con afectación del epitelio corneal. Y es por este motivo que la técnica de túnel intraestromal sin afectación del epitelio resulta ventajosa, ofreciendo una mayor satisfacción a los pacientes y una incidencia mucho menor de complicaciones y por consiguiente, de mejores resultados tanto en su utilización terapéutica como cosmética.

Un aspecto importante a tener en cuenta son las posibles complicaciones de la queratopigmentación, que incluyen infrapigmentación, sobrepigmentación, decoloración del pigmento, migración no deseada del pigmento, infección microbiana, perforación accidental de la córnea, problemas de cicatrización y uveítis.^(Mannis 1999) En nuestro experimento, el riesgo de infección fue controlado y evitado utilizando antibióticos intra y postoperatorios, así como tratando las mezclas de pigmentos con radiación gamma.

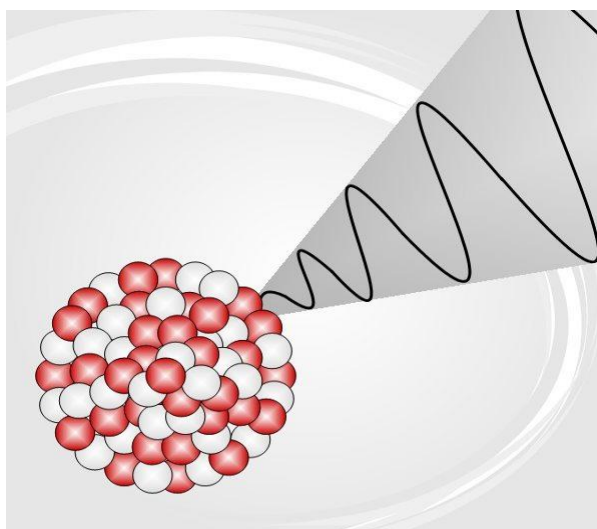


Figura 79: Radiación gamma

Debido a las altas energías que poseen, los rayos gamma constituyen un tipo de radiación ionizante capaz de penetrar en la materia más profundamente que la radiación alfa y la beta (figura 79). Pueden causar grave daño al núcleo de las células, por lo cual se usan para esterilizar equipos médicos y alimentos. En nuestro

caso fue utilizada para esterilizar las mezclas de pigmentos antes de ser inyectadas en el túnel estromal.

Esta forma de esterilización con rayos gamma no se había utilizado en los trabajos anteriormente publicados.^(Alió 2010, 2011a, Alió 2011b, 2012) El hecho de mezclar los pigmentos para conseguir colores cosméticamente más parecidos a un iris normal, pudiera aumentar el riesgo de contaminación de la mezcla final y por ello es recomendable esterilizar las mezclas antes de inyectarlas en el túnel intraestromal.

Los pigmentos colorantes utilizados en este trabajo fueron los pigmentos micronizados minerales. Debido a que la mayoría de sus componentes ya se han utilizado e investigado en medicina, se puede excluir la posibilidad de que se produzca absorción y toxicidad sistémica.

La mayoría de estas sustancias se utilizan en cosméticos, fármacos, y alimentos.^(Pitz 2002) 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,^(Pitz 2002) mientras que se sabe que los polialcoholes como el 1,6-hexanediol son ingredientes de fruta madura.^(Pitz 2002) En resumen, consideramos que los componentes de esta tinta no tienen potencial tóxico. En nuestros casos, como se puede ver a partir de los resultados, la queratopigmentación no dio lugar a ningún signo grave local de toxicidad.

Entre las indicaciones actuales de la queratopigmentación podemos dividir a los pacientes en grupos:

1. Pacientes con ceguera corneal (ojos sanos, con daño corneal): cicatrices o leucomas
 - a. Cicatrices que causan deslumbramiento, en cuyo caso se recomienda una queratopigmentación periférica y no en la zona pupilar, es decir con finalidad terapéutica.

- b. Cicatrices que causan ceguera, en los que se realiza la queratopigmentación por motivos estéticos cuando existe un alto riesgo de rechazo de trasplante corneal.
2. Pacientes con ceguera ocular sin esperanza de recuperación de las funciones visuales, que no tengan riesgo de ptisis bulbi, en los que el motivo es estético.
3. Pacientes con buena agudeza visual por motivos cosméticos.

Uno de los aspectos a discutir en el presente trabajo y en trabajos futuros, se trata de la seguridad de la técnica para ser utilizada con motivos cosméticos. En base a nuestros resultados, tanto la técnica de queratopigmentación intraestromal, como los pigmentos minerales utilizados, resultan seguros y no generan toxicidad en el modelo animal. Tanto la tolerancia a los pigmentos como la seguridad de la técnica, han quedado demostradas desde un punto de vista histológico, con la ausencia de inflamación y de neovascularización, desde el punto de vista del estudio confocal y desde el punto de vista inmunológico.

Con las técnicas de queratopigmentación se consiguen resultados estables y satisfactorios, pudiendo evitar la cirugía reconstructiva cosmética más extensa con fines estéticos y mejorando la calidad de vida del paciente.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio clínico, la queratopigmentación es un procedimiento quirúrgico seguro y no precisa el uso de materiales costosos. A fin de comprender mejor los efectos biológicos en la córnea queratopigmentada con pigmentos micronizados minerales, es preciso realizar estudios adicionales sobre la estabilidad de los pigmentos descritos a largo plazo.

8. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Es posible restaurar y/o mejorar el aspecto cosmético del globo ocular mediante técnicas de queratopigmentación ocular utilizando pigmentos micronizados minerales, para simular el color de iris deseado.

2. Los pigmentos micronizados minerales presentan una adecuada tolerancia y estabilidad durante el período de seguimiento de 3 meses en el modelo experimental animal utilizado, pudiendo resultar aptos para su empleo por motivos cosméticos y/o terapéuticos.

3. La técnica de queratopigmentación intraestromal ha resultado ser adecuada para el uso de pigmentos micronizados minerales con motivos cosméticos, con bajo índice de complicaciones, siendo la tinción perdurable en el tiempo, al no estar el pigmento en contacto directo con la película lagrimal.

4. Los pigmentos pueden mezclarse para conseguir una tonalidad cromática más adecuada, no observándose reacciones adversas debidas a su mezcla.

5. La tolerancia clínica, histológica e inmunológica de la queratopigmentación con los pigmentos micronizados minerales utilizados ha sido excelente.

6. Las técnicas de pigmentación corneal con pigmentos micronizados minerales presentan, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, una alternativa posible a las lentes de contacto cosméticas para simular diferentes colores de iris.

Resultan necesarios estudios de tolerancia a largo plazo y con otro tipo de pigmentos de diferente coloración para poder realizar un amplio catálogo de colores que ofrezca a la población un abanico de posibilidades en cuanto a colores se refiere.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alió JL, Rodríguez AE, Toffaha BT et al (2011a). "Femtosecond-assisted keratopigmentation for functional and cosmetic restoration in essential iris atrophy." J Cataract Refract Surg. **37**:1744-1747.

Alió JL, Rodríguez AE, Toffaha BT et al (2011b). "Keratopigmentation (corneal tattooing) for the management of visual disabilities of the eye related to iris defects." Br J Ophthalmol. **95**:1397-1401.

Alió JL, Rodríguez AE, Toffaha BT et al (2012). "Femtosecond-assisted keratopigmentation Double Tunnel Technique in the Management of a case of Urrets-Zavalía Syndrome." Cornea. **31**:1071-1074.

Alió JL, Sinerol B, Walewska-Szafran A, Miranda M (2010). "Corneal tattooing (keratopigmentation) to restore cosmetic appearance in severely impaired eyes with new mineral micronized pigments." Br J Ophthalmol. **94**:245-249.

Anastas CN, McGhee CN, Webber SK, Bryce IG (1995). "Corneal tattooing revisited: excimer laser in the treatment of unsightly leucomata." Aust N Z J Ophthalmol **23**(3): 227-230.

Beekhuis WH, Drost BH, Van der Velden/Samderubun EM (1998). "A new treatment for photophobia in posttraumatic aniridia: a case report." Cornea **17**(3): 338-341.

Bickford L. "Todo acerca del color de ojos (<http://www.eyecarecontacts.com>). Atención para el Cuidado del Ojo y la Visión. Consultado el 16 de marzo de 2013."

Burris TE, Holmes-Higgin DK, Silvestrini TA (1998). "Lamellar intrastromal corneal tattoo for treating iris defects (artificial iris)." Cornea **17**(2): 169-173.

Christensen HE, Schmidt H (1972). "The ultrastructure of tattoo marks." Acta Pathol Microbiol Scand A **80**(4): 573-576.

Clark EH (1947). "Tattooing of corneal scars with insoluble pigments." Plast Reconstr Surg (1946) **2**(1): 44-59.

Cofler T (1902). "Le tatouage de la cornee, tatouage chromatique, tatouage des paupieres." Arch Ophthalmol **19**: 606.

Duke-Elder S, Leigh AG (1965). System of ophthalmology. In Disease of the outer eye, part 2. St Louis, CV Mosby.

Eiberg H, Mohr J (1996). "Assignment of genes coding for brown eye colour (BEY2) and brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q." Eur J Hum Genet **4**(4): 237-241.

Eiberg H, Troelsen J, Nielsen M, Mikkelsen A, Mengel-From J, Kjaer KW, Hansen L (2008). "Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression." Human Genetics **123**(2): 177-187.

Fan L. "Color de ojos y la predicci3n de los fenotipos complejos de los genotipos (<http://www.sciencedirect.com>). Science Direct. Consultado el 16 de marzo de 2013."

Fini ME, Cui TY, Mouldovan A, Grobelny D, Galardy RE, Fisher SJ (1991). "An inhibitor of the matrix metalloproteinase synthesized by rabbit corneal epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(11): 2997-3001.

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

Frost P. "¿Por qué los europeos tienen el pelo y los ojos de tantos colores? (cogweb.ucla.edu). Estudios de Comunicación, Universidad de California, Los Angeles. Consultado el 16 de marzo de 2013."

Fujita H, Nishii Y, Yamashita K, Kawamata S, Yoshikawa K (1988). "The uptake and long-term storage of India ink particles and latex beads by fibroblasts in the dermis and subcutis of mice, with special regard to the non-inflammatory defense reaction by fibroblasts." Arch Histol Cytol **51**(3): 285-294.

Fujita H, Ueda A, Nishida T, Otori T (1987). "Uptake of india ink particles and latex beads by corneal fibroblasts." Cell Tissue Res **250**(2): 251-255.

Gifford S, Steinberg A (1927). "Gold and silver impregnation of cornea for cosmetic purposes." Am J Ophthalmol **10**: 240-247.

Hallock GG (1995). "Cosmetic trauma surgery." Plast Reconstr Surg **95**(2): 380-381.

Hoeyberghs JL (1999). "Fortnightly review: cosmetic surgery." BMJ **318**(7182): 512-516.

Hoguet A, Ritterband D, Koplin R, Wu E, Raviv T, Aljian J, Seedor J (2012). "Serious ocular complications of cosmetic iris implants in 14 eyes." J Cataract Refract Surg **38**(3): 387-393.

Hollick EJ, Coombes A (2006). "Lamellar keratoplasty and intracorneal inlay: An alternative to corneal tattooing and contact lenses for disfiguring corneal scars". Br J Ophthalmol **90**:127-252

Holth S (1931). "Revival of Galen's corneal staining with coppersulfate and tannine should be abandoned." Am J Ophthalmol (14): 378-379.

Islam N, Franks WA, from

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

Kobayashi A, Sugiyama K (2005). "In vivo confocal microscopy in a patient with keratopigmentation (corneal tattooing)." Cornea **24**(2): 238-240.

Krautbauer F (1928). "Tatowierung der cornea. ." Klin Monatsbl Augenheilkd **80**: 372.

Kuzan WM Jr. (1999). "Plastic surgery." J Am Coll Surg **188**: 171-177.

Lea PJ, Pawlowski A (1987). "Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis." Int J Dermatol **26**(7): 453-458.

Macartney HW, Tschesche H (1983). "Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases. Isolation, purification and characterisation." Eur J Biochem **130**(1): 71-78.

Mannis MJ, Eghbali K, Schwab IR (1999). "Keratopigmentation: a review of corneal tattooing." Cornea **18**(6): 633-637.

Montoliu L. "Información sobre el albinismo (<http://www.cnb.uam.es>). Centro Nacional de Biotecnología de España (CNB). Consultado el 16 de marzo de 2013."

Morris PJ. "Color de los ojos es más complejo que dos genes (<http://www.athro.com>). Athro Limited. Consultado el 16 de marzo de 2013."

Muller H, Van der Velden/Samderubun EM (1988). "Tattooing in maxillo-facial surgery." J Craniomaxillofac Surg **16**(8): 382-384.

Olander K, Kanai A, Kaufman HE (1983). "An analytical electron microscopic study of a corneal tattoo." Ann Ophthalmol **15**(11): 1046-1049.

Panda A, Mohan M, Chawdhary S (1984). "Corneal tattooing--experiences with "lamellar pocket procedure"." Indian J Ophthalmol **32**(5): 408-411.

Pischel DK (1930). "Tattooing of the cornea with gold and platinum chloride." Arch Ophthalmol **3**: 176-181.

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

Prota G, Hu DN, Vincensi MR, McCormick SA, Napolitano A (1998). "Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors." Exp Eye Res **67**(3): 293-299.

Reed JW (1994). "Corneal tattooing to reduce glare in cases of traumatic iris loss." Cornea **13**(5): 401-405.

Reed JW, Beran RF (1988). "Elimination of monocular diplopia by corneal tattooing." Ophthalmic Surg **19**(6): 437-439.

Rey S (2013). "Queratopigmentación: Histopatología, toxicidad, reactividad biológica. Estudio Experimental." Director: Jorge L. Alió. Tesis Doctoral. Departamento de Patología y Cirugía. Universidad Miguel Hernández, Elche-Alicante.

Rothschild L (1918). "Intracorneal tattooing on animals." Am J Ophthalmol **1**: 749.

Roy JN (1938). "Tattooing of the Cornea." The Canadian Medical Association Journal 436-438.

Schimdt (2010). "Artificial Iris." Consultado en <http://www.dr-schmidt-iol.de/typolight/home.html>. Consultado el 7 de Abril de 2013

Sekundo W (1996). Refraktive chirurgie. In: Collins JF, Augustin AJ. Berlin, Springer Verlag.

Sekundo W, Seifert P, Seitz B, Loeffler KU (1999). "Long-term ultrastructural changes in human corneas after tattooing with non-metallic substances." Br J Ophthalmol **83**(2): 219-224.

Singh S, Satani D, Patel A, Vhankade R (2012). "Colored cosmetic contact lenses: an unsafe trend in the younger generation." Cornea **31**: 777-779.

Sirerol B, Walewska-Szafran A, Alió JL, et al (2011). "Tolerance and Biocompatibility of Micronized Black Pigment for Keratopigmentation Simulated Pupil Reconstruction." Cornea 30: 344-350.

Southworth L. "¿Son los ojos grises iguales a los azules en términos de genética? (<http://www.thetech.org>). Museo Tecnológico de Innovación. Consultado el 17 de marzo de 2013."

Takahashi J, Sakimoto T, Kitano S (1990). "The phagocytosis in the stroma of tattooed cornea." Atarashii Ganka. **7**: 725-728.

Taylor CB (1872). "On the Modern Art of Tinting Opacities of the Cornea." Br Med J **2**(610): 271.

Tyson "N.Y. Med Rec, June 1894, 709. Wood's System of Ophthal. Operations, 1911:11, 1002."

Van der Velden EM, de Jong BD, van der Walle HB, Stolz E, Naafs B (1993). "Tattooing and its medical aspects." Int J Dermatol **32**(5): 381-384.

Van der Velden-Samdeerubun EM, Kok JH (1994). "Dermatography as a modern treatment for colouring leukoma corneae. ." Cornea(13): 349-353.

Veldman PB, Behlau I, Soriano E, Starling JC, Pineda R (2012). "Two cases of cosmetic iris implant explantation secondary to uveitis, glaucoma, and corneal decompensation." Arch Ophthalmol **130**(6): 787-789.

Von Wecker L (1870). "Tatouage de la cornee." Union Med **27**: 41.

Wessels IF, Wessels GF (1996). "Mechanized keratocropigmentation: corneal tattooing with the blepharopigmentor." Ophthalmic Surg Lasers **27**(1): 25-28.

Wiegmann E (1929). "Is tattooing according to knapp entirely without danger? ." Am J Ophthalmol **12**: 431.

Ziegler S (1922). "Multicolor Tattooing of the Cornea." Trans Am Ophthalmol Soc(20): 71-87.



La autora

M. Alejandra Amesty Morello