



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

RONALDO ANTONIO DA SILVA

**A reação inflamatória nas meninges desencadeada
pela punção subaracnoidea através da pele tatuada
pode evoluir para aracnoidite adesiva?**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof.^a Titular Eliana Marisa Ganem

Botucatu

2019

Ronaldo Antonio da Silva

**A reação inflamatória nas meninges desencadeada
pela punção subaracnoidea através da pele tatuada
pode evoluir para aracnoidite adesiva?**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof.^a Titular Eliana Marisa Ganem

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Ronaldo Antonio da.

A reação inflamatória nas meninges desencadeada pela punção subaracnoidea através da pele tatuada pode evoluir para aracnoidite adesiva? / Ronaldo Antonio da Silva. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Marisa Ganem

Capes: 40102130

1. Síndromes neurotóxicas. 2. Tatuagem. 3. Anestesia. 4. Aracnoidite. 5. Coelho.

Palavras-chave: Anestesia raquídea; Aracnoidite adesiva; Coelhos; Síndromes neurotóxicas; Tatuagem.

Dedicatória

A minha mãe, Malu Deléu, mulher forte e determinada, que superou as adversidades com muito amor no coração. Tenho orgulho de quem você é e da família que construiu.

À minha irmã, Carmen, por me apoiar e caminhar ao meu lado.

Aos meus tios, Cecília e Deléu, que sempre me dedicaram muito amor e me ajudaram a chegar aonde cheguei.

Ao meu companheiro Marcel Bueno, que sentiu minha ausência, mas entende meus propósitos.

À minha sobrinha, Beatriz, a qual amo desde o primeiro momento em que soube que chegaria. Cheia de graça, inteligente, carinhosa e com muita personalidade. Resgatou nossa criança interior e nos faz, a cada dia, pessoas melhores.

Agradecimento Especial

À Prof.^a Titular Eliana Marisa Ganem

Tornou se minha amiga durante a residência médica. Sempre a admirei por sua sinceridade. Professora dedicada, docente titulada e pesquisadora nata, com idéias brilhantes e produção científica invejável. Adoro estar ao seu lado, conversar e ouvir seus conselhos. Para mim é um privilégio e uma alegria conviver com você.

Muito obrigado

Agradecimentos

Aos docentes do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu por minha formação e incentivo à pesquisa

A todos os funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e, em especial, a Sra. Joana Jacirene Costa Teixeira, que me auxilia desde a residência médica

Aos colegas do Departamento de Anestesiologia do Hospital A. C. Camargo Câncer Center, com os quais divido o dia a dia da profissão e também a amizade

Ao Ricardo Santos de Lima, secretário do Departamento de Anestesiologia do Hospital A. C. Camargo Câncer Center, por toda a ajuda com a parte computacional

À Prof.^a Dra. Vania Maria de Vasconcelos Machado, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ de Botucatu, pelo auxílio com a ultrassonografia.

À Prof.^a Titular Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas.

À Tatiane de F. Pineiz Biondo, da Seção Técnica de Pós-graduação, por todo o auxílio durante meu curso, competência, carinho e amizade

À FAPESP, pelo auxílio pesquisa (Processo 140454/2015-2) e ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 2015/054688-6) e aos ex graduandos Camila Camara Viviani dos Santos (*In Memoriam*) e Ricardo Santos Zuza, pela ajuda na execução desta pesquisa.

***“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”***

ARTHUR SCHOPENHAUER

RESUMO

Silva RA. A reação inflamatória nas meninges desencadeada pela punção subaracnoidea através da pele tatuada pode evoluir para aracnoidite adesiva? [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2019.

Justificativa e objetivo: Cada vez mais o anestesiológico se depara com a necessidade de decidir por realizar ou não bloqueio de neuroeixo através da pele tatuada, já que o número de pessoas com tatuagem tem aumentado. Neste estudo foi avaliado se a punção subaracnoidea sobre área tatuada provoca alterações inflamatórias agudas nas meninges e medula espinal e se pode evoluir para aracnoidite adesiva. **Material e Método:** 42 coelhos machos foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos de 14 animais: G1, punção subaracnoidea através de pele não tatuada e injeção de solução salina, cativoiro 30 dias; G2, punção subaracnoidea através de pele tatuada e injeção de solução salina, cativoiro 30 dias; G3, punção subaracnoidea através de pele tatuada e injeção de solução salina, cativoiro 360 dias. Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina e realizou se punção subaracnoidea, guiada por ultrassom, no espaço intervertebral entre S1 – S2, com injeção de solução salina 0,2mL. Após período de cativoiro os animais foram sacrificados, sob anestesia, por decapitação e a porção lombossacra da medula espinal foi removida para análise histológica. **Resultados:** Nenhuma alteração histológica foi encontrada nos animais do grupo 1. Onze animais do grupo 2 apresentaram focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e/ou aracnoide. No grupo 3, oito coelhos apresentaram infiltrado inflamatório linfocitário ou linfoplasmocitário perivascular e também nas meninges, associado ou não ao espessamento e à adesão da pia-máter e aracnoide em alguns casos e cinco coelhos apresentaram, apenas, espessamento da pia-máter. **Conclusão:** A punção subaracnoidea, através da pele tatuada de coelhos, desencadeia alterações inflamatórias agudas nas meninges e evolui para aracnoidite adesiva

Palavras chave: síndromes neurotóxicas; tatuagem; raquianestesia; aracnoidite adesiva; coelhos

ABSTRACT

Silva RA. Can an inflammatory reaction in the meninges, caused by spinal puncture through tattooed skin, evolve into adhesive arachnoiditis? [Ph.D. thesis]. Botucatu: Medical School (Unesp); 2019.

Background and Objectives: As the number of people with tattoos has been increasing, anesthesiologists are more and more faced with the decision to perform a neuraxial blockage through tattooed skin. In this study, we evaluated the possibility of puncture through tattooed skin determines acute inflammatory changes in the meninges and spinal cord and later evolve into adhesive arachnoiditis. **Method:** Forty-two male rabbits were randomized into 3 equal groups of 14: G1, spinal puncture through non-tattooed skin and saline solution injection; G2, spinal puncture through tattooed skin and saline solution injection, captive for 30 days; G3, spinal puncture through tattooed skin and saline solution injection, captive for 360 days. The animals were anesthetized and ultrasound-guided spinal puncture was performed in the intervertebral spaces between S1–S2. During the period of captivity, the animals were clinically assessed for sensitivity and motor function. After that, they were sacrificed and the lumbosacral portion of the spinal cord was excised for histological analysis. **Results:** No histological changes were found on group 1. Eleven animals from group 2 presented with foci of perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in the pia mater and/or arachnoid. In Group 3, 8 rabbits presented with inflammatory changes in the meninges, which were associated with thickening and/or adhesion of the pia mater and arachnoid in some cases and 5 rabbits presented only thickening of pia-mater. **Conclusions:** Spinal puncture through tattooed skin of rabbits can trigger acute inflammatory changes in the meninges and evolve into adhesive arachnoiditis.

Keywords: neurotoxicity syndromes; tattooing; spinal anesthesia; arachnoiditis; rabbits

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biópsia de pele de coelho 30 dias após procedimento mostrando pigmento na transição dermoepidérmica.....	21
Figura 2	Pele de coelho imediatamente após ser tatuado.....	22
Figura 3	Pele de coelho 30 dias após tatuagem.....	23
Figura 4	Imagem guiada por ultrassonografia na abordagem sagital do espaço articular S1-S2. A agulha foi inserida no espaço de S1-S2 (seta). A vértebra sacral é hiperecoica e o espaço subaracnoideo é hipoeicoico.....	25
Figura 5	Organograma da avaliação histológica.....	27
Figura 6	Tecido nervoso normal(A), vasos sanguíneos normais (B) e meninges (C) normais de animal do G2 (HE 40X).....	29
Figura 7	Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter em região posterior da medula espinal (A e B), perivascular intraparenquimatoso (C), tecido nervoso normal (D), em coelho do G2 (HE 200X).....	31
Figura 8	Tecido nervoso normal (A) de animal, foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter, região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D), em coelho do G2 (HE100x).....	32
Figura 9	Foco de infiltrado inflamatório linfocitário na pia-máter e aracnoide (A) de animal do G2 (HE100x).....	33
Figura 10	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e na aracnoide em animal do G3 (HE 200x).....	35

Figura 11 Espessamento da pia-máter em animal do G3 (HE 200x).....**36**

Figura 12 Foco de aderência pia- máter com aracnoide em animal do G3
(HE 200x).....**37**

LISTA DE TABELAS e QUADROS

TABELA 1	Média e desvio padrão do peso corporal e comprimento da medula espinal dos animais dos grupos G1, G2, G3.....	28
QUADRO 1	Características histológicas dos animais pertencentes ao G2.....	30
QUADRO 2	Características histológicas dos animais pertencentes ao G3.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. HIPÓTESE.....	17
3. OBJETIVO.....	18
4. MATERIAL E MÉTODO	19
4.1 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	19
4.2 Modelo de estudo	19
4.3 Método estatístico.....	19
4.4 Grupos experimentais.....	19
4.4.1 Justificativa para composição do G1	21
4.5 Sequência experimental	21
4.5.1 Protocolo tatuagem (fase 1)	21
4.5.2 Protocolo punção subaracnoidea (fase 2).....	23
4.5.3 Período de observação clínica (fase 3)	25
4.5.4 Preparo de lâminas e avaliação histológica (fase 4)	26
5. Resultados	28
6. Discussão	38

7. Conclusão	41
8. Referências	42
9. Apêndice.....	47

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização tatuar o corpo tem conotações cerimoniais, religiosas, tribais e estéticas tanto para indivíduos como para sociedades.^{1,2} A partir do início dos anos 1990, com a valorização da cultura pop, tatuagens se tornaram objeto de desejo, principalmente entre adultos jovens.³⁻⁵

A técnica da tatuagem consiste em depositar o pigmento da tinta ao longo do caminho que a agulha percorre na epiderme até o interior da derme.^{6,7} Após sua introdução na pele os pigmentos são rapidamente englobados pelos fagossomas dos queratinócitos e de outras células fagocíticas, como os fibroblastos, os macrófagos e os mastócitos. Uma parte da tinta é eliminada por via linfática. As estruturas da epiderme, da junção dermo-epidérmica e da derme papilar perdem a sua organização estrutural e passam a apresentar aspecto inflamatório. Em aproximadamente um mês a camada basal se reconstitui e os pigmentos ficam contidos no interior das células basais. Finalmente as células fagocitárias são reagrupadas na junção dermo-epidérmica sob coxim de tecido de granulação que contém colágeno. A eliminação das partículas que restaram sob a epiderme se faz por descamação.⁸⁻¹¹

Ao final de um mês a tatuagem é considerada estável e as partículas de tinta permanecem, exclusivamente, no interior de fibroblastos da derme, aprisionadas em conglomerado de tecido conjuntivo. O pigmento que permanece no tecido fibroso da derme é o responsável pela coloração final.⁸

O corante dos pigmentos utilizados para realização da tatuagem pode causar reações agudas ou crônicas na pele. As reações agudas podem ser alérgicas, eritematosas, pruriginosas, edematosas e infecciosas.¹²⁻¹⁵ Normalmente a tatuagem que é antiga não apresenta processos inflamatórios e infecciosos, mas existe a possibilidade de ocorrer reação de hipersensibilidade crônica ou hiperplásica.¹⁶ Dentre os pigmentos, os tons de vermelho estão associados a maior número de complicações e reações mais tardias.¹⁷⁻¹⁹

Pouco se conhece sobre as possíveis implicações da introdução de uma agulha para realização de anestesia regional sobre pele tatuada, principalmente pelas características dos pigmentos e as possíveis reações que estes possam desencadear ao entrarem em contato com o sistema nervoso central.

Nos Estados Unidos 25% da população com idade entre 24 e 50 anos possuem tatuagens, sendo que, aproximadamente 50% são mulheres. Este fato é preocupante porque muitas mulheres estão em idade fértil e podem, em algum momento, serem submetidas a anestesia raquidiana.³ Como o número de pessoas com tatuagem tem aumentado, cada vez mais o anestesiológista se depara com a necessidade de decidir por realizar ou não um bloqueio de neuroeixo através da pele com tatuagem.^{20,21}

Foi demonstrado que, independentemente da existência do estilete, fragmentos de tecidos ficam retidos no interior da agulha utilizada para punção e que a injeção de líquidos através destas agulhas resultaria na introdução destes fragmentos em locais mais profundos, inclusive no espaço subaracnoideo.²²⁻²⁴

É conhecido, desde meados do século passado, o desenvolvimento de tumor epidermóide iatrogênico após múltiplas injeções de antibióticos no neuroeixo de crianças.²⁵ Subsequentemente foram descritos casos similares em adultos.²⁶⁻²⁸

As agulhas sem estiletes são as mais propensas a reterem fragmentos em seu interior, contudo a presença de restos de tecidos também foi encontrada em agulhas com mandril.

Puolakka et al (2000) examinaram microscopicamente a ponta de agulhas de Quincke, de Whitacre e de Sprotte calibre 27G introduzidas no espaço subaracnoideo de cadáver e encontraram fibras musculares e células epiteliais principalmente na agulha de Quincke (56%).²⁹

Ozyurt et al (2000) coletaram 1 ml de liquor imediatamente após a inserção da agulha de Quincke de calibres 22G, 25G e 27G e relataram a presença de células escamosas no liquor, principalmente nas agulhas de maior calibre.³⁰

Teoricamente, ao realizar-se a anestesia do neuroeixo, a introdução da agulha em local onde existe tatuagem pode conduzir pigmentos para planos mais profundos, depositando-os, após a injeção de soluções, nos espaços subaracnoideo ou peridural.⁶

São relatados casos de pacientes que desenvolveram atrofia crônica de músculos adjacentes à tatuagem o que resultou em disfunção neuromuscular com neuropatia de plexo braquial.^{31,32} O mecanismo desencadeador das lesões não foi bem estabelecido, mas aventou-se a hipótese de que reações imunes secundárias ao processo inflamatório ou efeitos tóxicos desencadeados pelo pigmento poderiam ser os responsáveis.

Também foi publicado relato de paciente submetida à analgesia de parto na qual a agulha peridural foi introduzida em espaço através da tatuagem. Algumas horas após a parturiente queixou-se de dor e queimação no local em que havia sido introduzido o cateter. Como a tatuagem era vermelha, não foi possível detectar a presença de sinais inflamatórios. Os sintomas regrediram em 24 horas e como hipótese desencadeadora dos sintomas foi sugerido que a presença de fragmentos de tecido, contendo pigmentos de tatuagem, poderia ter causado irritação nos tecidos lombares profundos.³³

Autores questionam se o pigmento contido na tatuagem pode desencadear aracnoidite química.^{34,35} Sabe-se que a aracnoidite adesiva pode ser desencadeada por diversos agentes administrados no espaço subaracnoideo ou peridural.³⁶

Contrastes iodados, corticosteroides administrados no espaço peridural e no subaracnoideo, trauma, sangue, preservativos e conservantes contidos em muitas soluções, contaminantes, como detergentes e até mesmo anestésicos locais, foram associados à aracnoidite adesiva.³⁷ Foi possível desencadear aracnoidite adesiva em modelo experimental em cães após injeção subaracnoidea de betametasona³⁸, de metilprednisolona³⁹ e do antidepressivo amitriptilina.⁴⁰

Muito pouco é descrito sobre a possibilidade de complicações neurológicas que ocorreram após anestesia do neuroeixo cuja punção foi realizada através de pele tatuada. Não existem pesquisas que suportem a presença de efeitos tóxicos diretos do pigmento da tinta proveniente de uma tatuagem já cicatrizada sobre o sistema nervoso central.^{7,41}

Apesar de não existirem, até os dias atuais, evidências documentadas ou provas científicas que apoiem a hipótese de que os pigmentos da tatuagem possam causar aracnoidite ou outras complicações neurológicas, o princípio da precaução orienta que se evite a punção em cima da pele tatuada.³⁴

Estudo experimental em coelhos mostrou que, seis meses após a punção subaracnoidea sobre pele tatuada, 33,3% dos animais estudados apresentavam focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e/ou aracnoide. Este tipo de inflamação indica que, em contato com um agente agressor permanente (insolúvel), os linfócitos desencadearam resposta imunológica, atraindo os plasmócitos, que são os responsáveis pelas respostas humorais contra o agente lesivo.²⁴

Permanece a dúvida se o infiltrado inflamatório encontrado previamente reflete a resolução de uma lesão ou o início de um processo que resultaria em aracnoidite adesiva.

2 HIPÓTESE

A resposta inflamatória nas meninges, observada após punção subaracnoidea através da pele tatuada de coelhos, aparece precocemente, poucas semanas após o contato do pigmento da tinta de tatuagem com as meninges e evolui para aracnoidite adesiva.

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar se a reação inflamatória nas meninges, desencadeada pela punção subaracnoidea através da pele tatuada de coelhos, aparece precocemente e evolui para aracnoidite adesiva.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)

A presente pesquisa foi submetida à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Certificado 1151/2015 CEUA) e seguiu as orientações do *guideline* ARRIVE⁴² e também a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.

4.2 MODELO DE ESTUDO

Este estudo é comparativo e randomizado e a análise histológica dos resultados foi encoberta. Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador e por envelopes selados opacos.

4.3 MÉTODO ESTATÍSTICO

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso e ao comprimento de medula espinal foram calculados média e desvio padrão e aplicado o teste de ANOVA One -Way.

Admitindo-se porcentagem de lesão no grupo punção sem tatuagem de 0%, poder de teste igual a 0,80 e erro tipo I igual a 0,05, estimou-se que seriam necessários 14 coelhos por grupo para detectar diferenças estatisticamente significativas igual ou superior a 5% de lesão.

4.4 Grupos Experimentais

Foram utilizados 45 coelhos adultos jovens (6 meses de idade), machos, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3300 e 5400g e comprimento da

medula espinal (espaço medido da base do crânio ao espaço lombossacro)⁴³ entre 38 e 41cm, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Na seleção dos animais não foram incluídos aqueles que não apresentassem aspecto sadio. Os critérios de exclusão foram os que tivessem necessidade de mais de uma punção subaracnoidea e/ou punção traumática, bem como dificuldade na identificação do espaço subaracnoideo ou os que ficassem gravemente doente ou morressem durante o período de cativeiro.

Quarenta e dois animais foram randomizados, em 3 grupos experimentais, cada um com 14 animais:

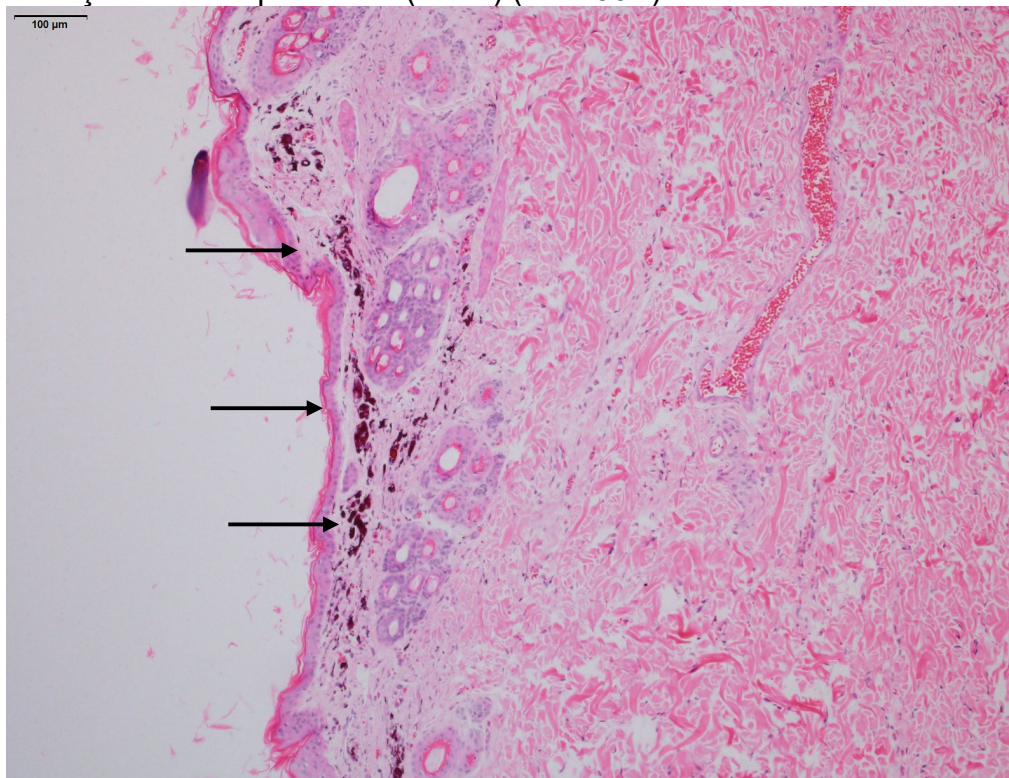
G1 – coelho sem tatuagem – punção subaracnoidea guiada por ultrassom e injeção de solução salina 0,9% - cativeiro 30 dias

G2 – coelho com tatuagem - punção subaracnoidea guiada por ultrassom e injeção de solução salina 0,9% - cativeiro 30 dias

G3 – coelho com tatuagem - punção subaracnoidea guiada por ultrassom e injeção de solução salina 0,9% - cativeiro 360 dias

Os três coelhos restantes, que não foram alocados em nenhum grupo, foram tatuados e, após 30 dias, realizou se uma biópsia de pele no centro da tatuagem para se avaliar a característica tecidual das mesmas. (figura 1)

Figura 1 – Biópsia de pele de coelho mostrando pigmento localizado na transição dermo epidérmica (setas) (HE 100X)



4.4.1 Justificativa para composição do grupo experimental G1

O G1 teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos que o volume da solução administrada determinaria sobre o tecido nervoso, uma vez que aumentos súbitos na pressão liquórica podem causar comprometimento do fluxo sanguíneo medular, isquemia e desencadear lesão neurológica⁴⁴, além de também excluir possível injeção intraneural da solução.⁴⁵

4.5 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

O experimento foi dividido em 4 fases:

4.5.1 – Protocolo tatuagem – fase 1

4.5.2 – Protocolo punção subaracnoidea – fase 2

4.5.3 – Período de observação clínica – fase 3

4.5.4 – Preparo das lâminas e avaliação histológica – fase 4

4.5.1 Protocolo tatuagem (fase 1)

A tatuagem foi realizada com diâmetro aproximado de 2cm, por tatuador profissional, utilizando agulha 3rL Blackline e tinta pigmento vermelho Electric Ink®,

com angulação da caneta a 45°, de forma a garantir deposição de maior quantidade do pigmento, na transição dermoepidérmica, e reduzir inflamação local.⁴⁶

Para tal, todos os animais, após jejum alimentar de 12 horas e livre acesso a água, foram pesados e anestesiados com cloridrato de xilazina (3mg.kg^{-1}) e cloridrato de cetamina (10mg.kg^{-1}) intravenosos e submetidos à sequência experimental descrita abaixo:

1. Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa.
2. Limpeza da região lombossacra com água e sabão.
3. Tricotomia.
4. Limpeza do local com solução salina a 0,9% estéril.
5. Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
6. Realização da tatuagem na região sacral nos animais do G2 e G3 (Figura 2).
7. Observação clínica até recuperação da anestesia
8. Manutenção em cativeiro por 30 dias para cicatrização da tatuagem (Figura3).

Figura 2 - Pele de coelho imediatamente após ser tatuado



Figura 3 - Pele de coelho 30 dias após a tatuagem



4.5.2 Protocolo punção subaracnoidea (fase 2)

A punção subaracnoidea foi executada 30 dias após a realização da tatuagem nos grupos G2 e G3 e em área não tatuada no G1. Para tal, todos os animais, após jejum alimentar de 12 horas e livre acesso a água, foram pesados e anestesiados com cloridrato de xilazina (3mg.kg^{-1}) e cloridrato de cetamina (10mg.kg^{-1}) intravenosos e submetidos à sequência experimental descrita abaixo:

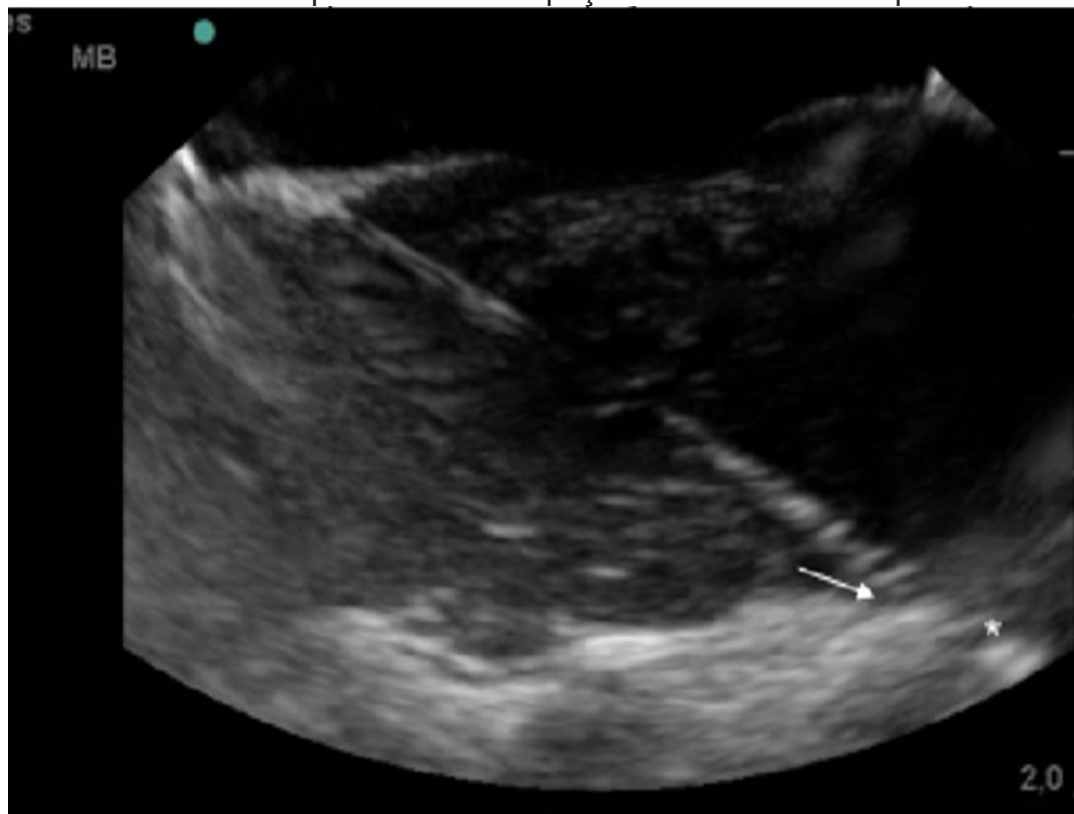
1. Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa.
2. Medida do comprimento da medula espinal.
3. Limpeza da região lombossacra com água e sabão.
4. Tricotomia.
5. Limpeza do local com solução salina a 0,9% estéril.
6. Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
7. Lavagem com solução salina a 0,9% estéril
8. Colocação de campo estéril.

9. Palpação e identificação dos espaços intervertebrais.
10. Identificação do espaço subaracnoideo e punção subaracnoidea sob orientação de ultrassonografia. (figura 4)
11. Injeção da solução salina a 0,9% estéril.
12. Retirada do animal da mesa.
13. Observação clínica até recuperação da anestesia.

Todas a punções subaracnoideas foram realizadas pelo mesmo pesquisador, proficiente na técnica, utilizando se aparelho de ultrassonografia Sonosite®, modelo M – turbo, com recurso de doppler tecidual de parede (TDI) e transdutor linear na frequência de 10MHz e agulha 22 ½ – gauge Quincke, com inclinação de 45°, na linha mediana.⁴⁷

No coelho o espaço mais caudal que permite a abordagem do espaço subaracnoideo encontra-se entre as vértebras S1 e S2. Para a identificação deste espaço e a determinação do local da punção intervertebral, palpam-se as duas tuberosidades do osso ilíaco e identifica-se o processo espinhoso da primeira vértebra sacral, deslizando-se o dedo 1,5 cm a 2 cm em direção caudal. O espaço S1-S2 localiza-se 1 cm caudal ao processo espinhoso da primeira vértebra sacral. Após identificação do ligamento amarelo, guiou se a agulha, sob visão ultrassonográfica até o espaço subaracnoideo, e injetou se solução salina a 0,9% estéril 0,5 µL/cm do comprimento da coluna vertebral dos animais (0,2mL).^{26,48} As dificuldades nas punções foram anotadas.

Figura 4 - Imagem guiada por ultrassonografia na abordagem sagital do espaço articular S1-S2. A agulha foi inserida no espaço de S1-S2 (seta). A vértebra sacral é hiperecoica e o espaço subaracnoideo é hipoecoico



4.5.3 Período de Observação Clínica (Fase 3)

Os animais foram avaliados 1h após a punção subaracnoidea e uma vez ao dia por 30 dias (G1 e G2) e 360 dias (G3).

Em cada animal testava se déficit motor baseado na escala de Drummond e Moore modificada⁴⁹ ou seja:

- 3 - Movimento livre das extremidades inferiores.
- 2 - Assimetria e limitação para sustentar o corpo e para deambular por alteração nas extremidades inferiores.
- 1 - Inabilidade para sustentar o corpo pelas extremidades inferiores
- 0 - Paralisia das extremidades inferiores.

A resposta à nocicepção foi avaliada pela preensão com pinça cirúrgica dente de rato nas extremidades superior e inferior, bem como na pele dos dermatomos torácicos, sacrais, lombares e nas orelhas, observando se retirada da pata, vocalização e expressão facial dos coelhos, sendo classificada em ausente ou

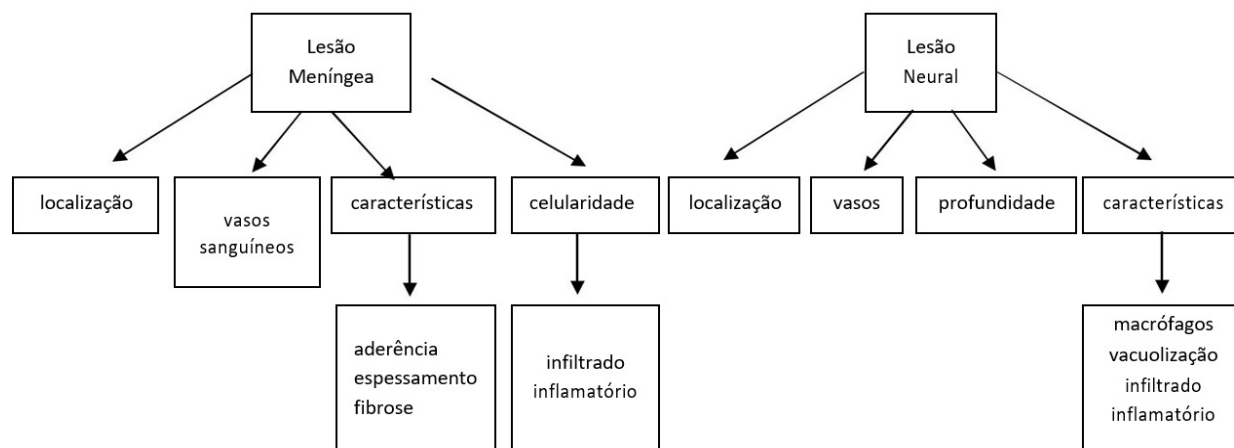
presente. Todos os testes foram realizados de acordo com os *guidelines* da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP).⁵⁰

4.5.4 Preparo das lâminas e avaliação histológica (Fase 4)

Após período de observação, os animais foram sacrificados por decapitação após a injeção intravenosa de cloridrato de xilazina (3mg.kg^{-1}) e cloridrato de cetamina (10mg.kg^{-1})

Para evitar a lesão tecidual por isquemia ou apoptose, o segmento lombossacro da medula espinal foi removido em tempo inferior a 3 minutos e fixado em solução de formalina tamponada a 10%. Após período de incubação de 7 dias, cortes do tecido nervoso foram realizados, com intervalo de 1cm, iniciando se 10cm acima do nível da punção até o final da cauda equina. A técnica de coloração utilizada para as lâminas histológicas foi hematoxilina e eosina (H&E).

Três pesquisadores, que fazem parte do grupo de pesquisa em neurotoxicidade da Faculdade de Medicina de Botucatu, avaliaram as lâminas quanto a presença ou ausência de lesão nervosa, descrevendo severidade e extensão, baseado em critérios pré-definidos. (figura 5)

Figura 5 - Organograma da avaliação histológica

4 RESULTADOS

Os grupos foram homogêneos com relação ao peso ($p=0,053$) e ao comprimento de medula espinal ($p=0,15$). (tabela 1)

Nenhum animal foi excluído da pesquisa por dificuldade na realização da punção ou na identificação do espaço subaracnoideo, bem como durante todo o período que permaneceram em cativeiro.

Nenhum dos coelhos, independente do grupo ou fase do estudo, apresentou alterações de motricidade, baseado na escala de Drummond e Moore modificada, bem como alterações da sensibilidade, de acordo com os testes realizados.

Nos animais do grupo 1 (G1) não foram observadas alterações histológicas na medula espinal, meninges e vasos sanguíneos. (figura 6)

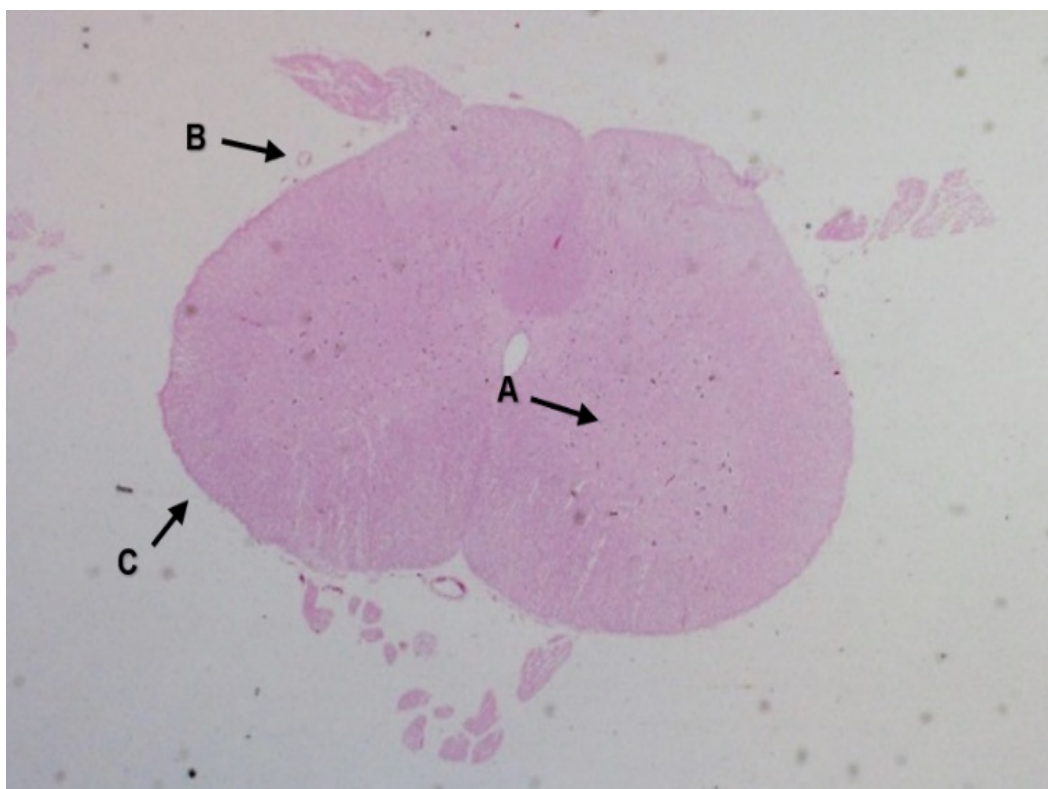
Onze animais do G2 (78,5%, $p<0,05$) apresentaram focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e/ou aracnoide (quadro 1, figuras 7, 8 e 9). Em 13 coelhos (92,8%, $p<0,05$) do G3 foram observadas alterações histológicas: oito coelhos apresentaram infiltrado inflamatório linfocitário ou linfoplasmocitário perivascular associados ou não ao espessamento e a adesão da pia-máter e aracnoide em alguns casos e, em cinco animais, apenas espessamento da pia-máter. (quadro 2, figuras 10,11 e 12)

TABELA 1 – Média e desvio padrão do peso corporal (g) e comprimento da medula espinal (cm) dos animais do G1, G2, G3

GRUPO	PESO CORPORAL	COMPRIMENTO DA MEDULA ESPINAL
G1	3850±411,8	40±0
G2	4507±475,7	40,1±0,3
G3	3900±381,7	40±0

G1 :GRUPO1 G2: GRUPO 2 G3:GRUPO 3

Figura 6 - Tecido nervoso normal (A), vasos sanguíneos normais (B) e meninges normais (C) em animal do G1 (HE 40x)



Quadro 1 - Características histológicas dos animais pertencentes ao G2

Coelhos	Fibrose Espessamento	Infiltrado inflamatório	Formação de Trabéculas	Necrose medula espinal
1	ausente	ausente	ausente	ausente
2	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente
3	ausente	ausente	ausente	ausente
4	ausente	ausente	ausente	ausente
5	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, lateral e posterior, <10%	ausente	ausente
6	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, lateral e posterior, <10%	ausente	ausente
7	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na aracnoide, região posterior <10%	ausente	ausente
8	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, lateral e posterior <10%	ausente	ausente
9	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, lateral e posterior, <10%	ausente	ausente
10	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente
11	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente
12	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente
13	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente
14	ausente	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter, região posterior, <10%	ausente	ausente

Figura 7 - Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter em região posterior da medula espinal (A e B), perivascular intraparenquimatoso (C), tecido nervoso normal (D), em coelho do G2 (HE 200X)

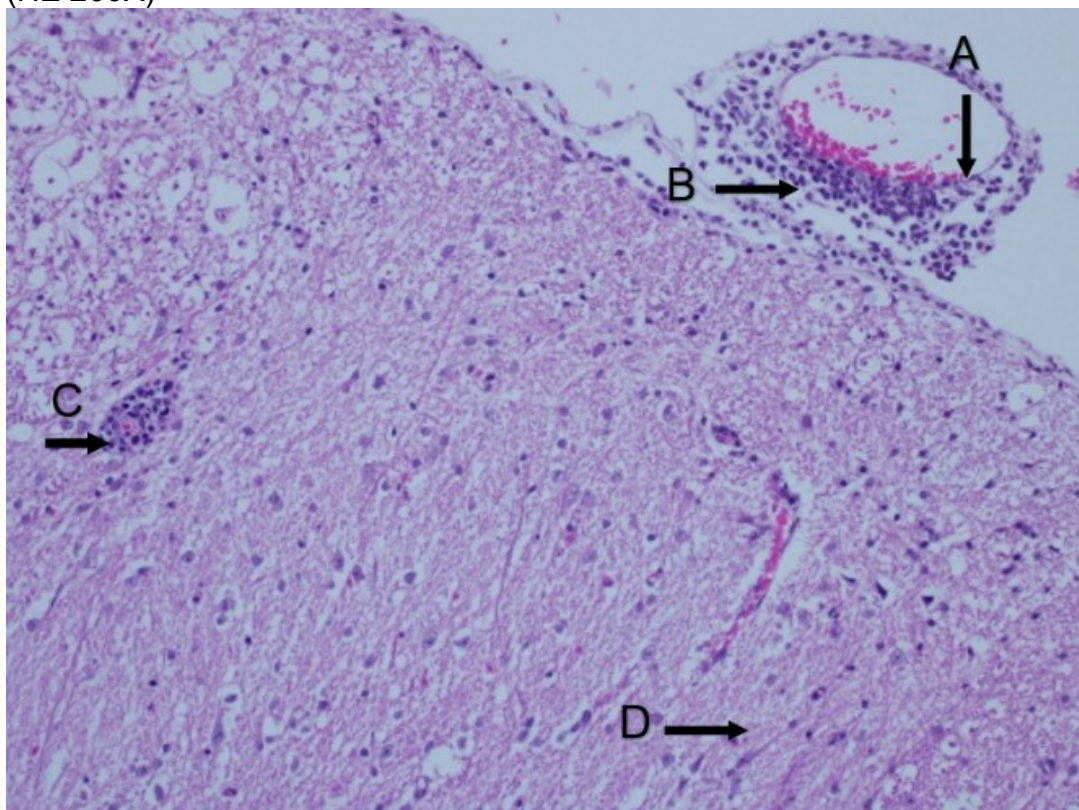


Figura 8 – Tecido nervoso normal (A), Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter, região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D) em animal do G2 (HE 100x)

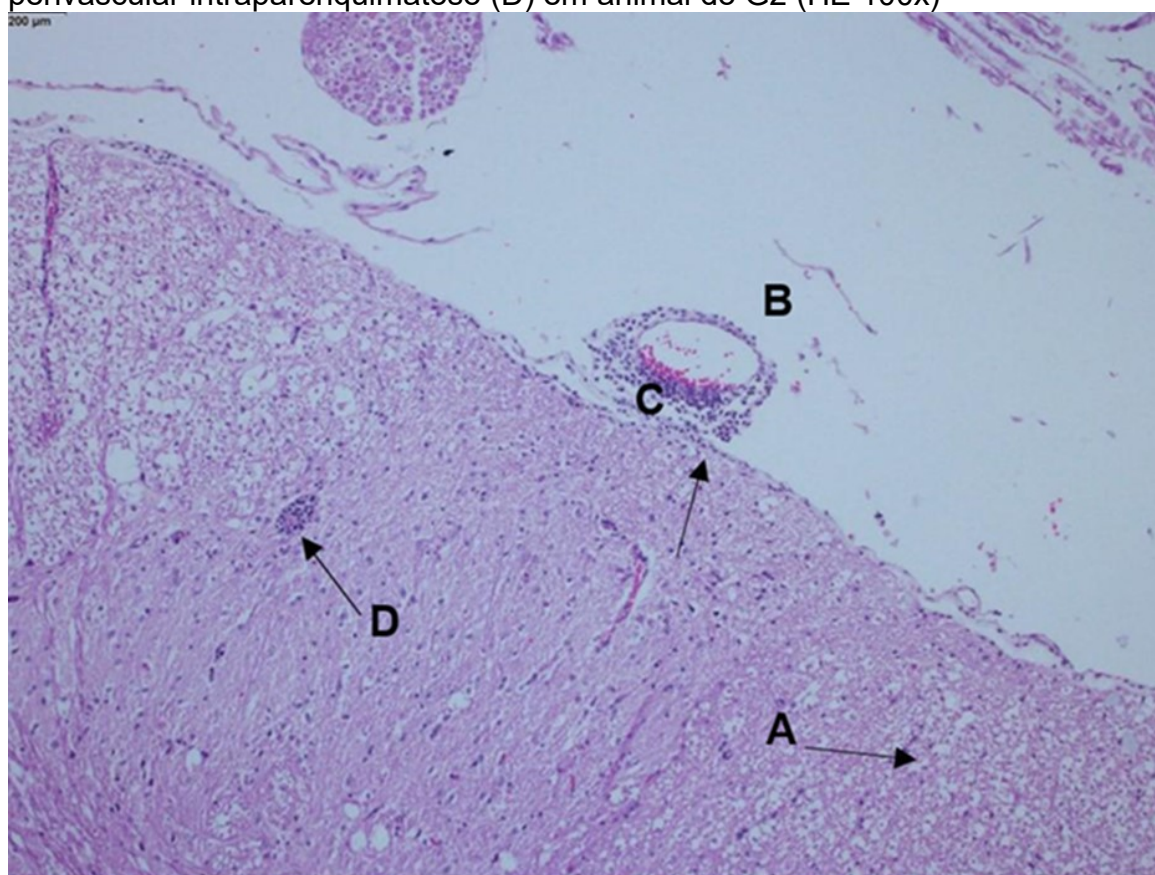
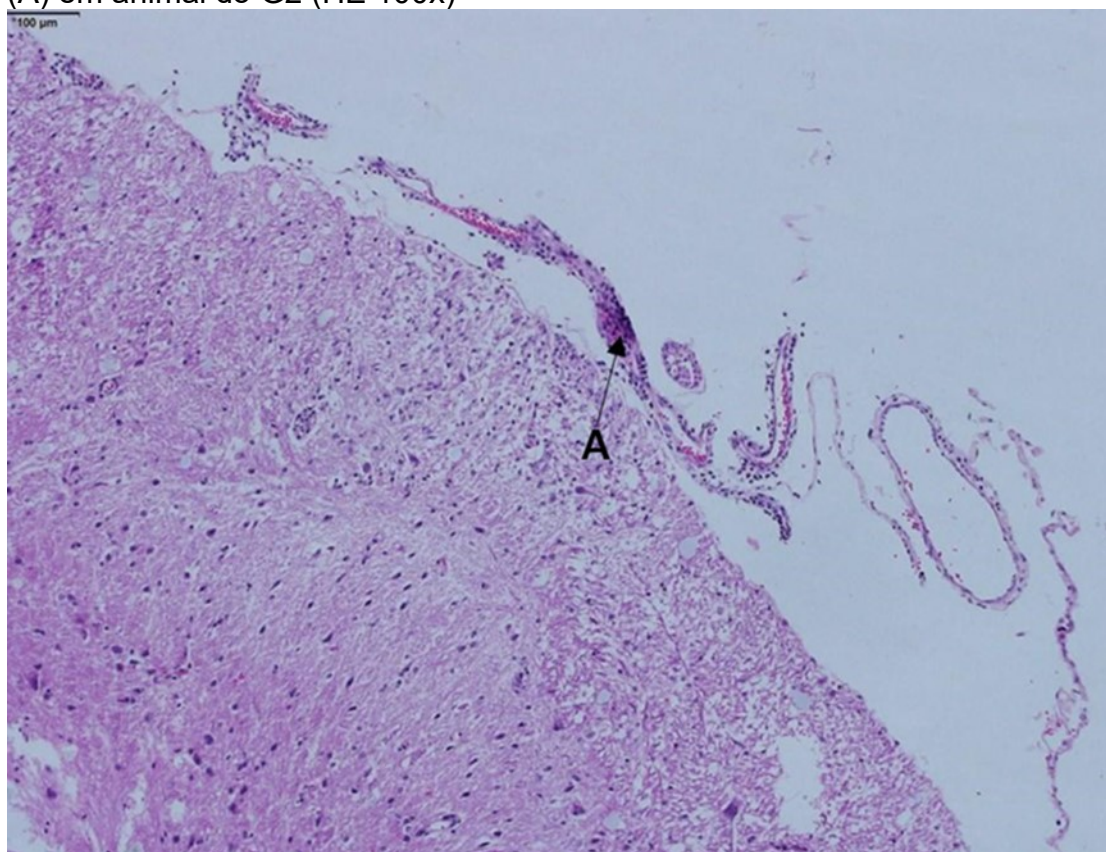


Figura 9 – Foco de infiltrado inflamatório linfocitário na pia-máter e aracnoide (A) em animal do G2 (HE 100x)



Quadro 2 - Características histológicas dos animais pertencentes ao G3

Coelhos	Fibrose Espessamento	Infiltrado inflamatório	Formação de Trabéculas	Necrose medula espinal
1	ausente	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, posterior e lateral, <10%	ausente	ausente
2	Espessamento pia-máter e aracnoide	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região anterior, posterior e lateral, <10%	Aderência pia-máter e aracnoide	ausente
3	Focos de espessamento da pia-máter	ausente	ausente	ausente
4	ausente	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide, região posterior, <10%	ausente	ausente
5	Espessamento pia-máter	Infiltrado inflamatório linfocitário, região posterior, <10%	Aderência pia-máter e aracnoide	ausente
6	Focos de espessamento da pia-máter	Infiltrado inflamatório linfocitário, região anterior, lateral e posterior, <10%	ausente	ausente
7	Focos de espessamento da pia-máter	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário, região posterior, <10%	ausente	ausente
8	Focos de espessamento da pia-máter	ausente	ausente	ausente
9	Focos de espessamento da pia-máter	ausente	ausente	ausente
10	Focos de espessamento da pia-máter	Infiltrado linfocitário, região anterior, lateral e posterior, <10%	ausente	ausente
11	Focos de espessamento da pia-máter	Infiltrado linfocitário, posterior, <10%	ausente	ausente
12	ausente	ausente	ausente	ausente
13	Focos de espessamento da pia-máter	ausente	ausente	ausente
14	Focos de espessamento da pia-máter	ausente	ausente	ausente

Figura 10 - Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e na aracnoide em animal do G3 (HE 200x)

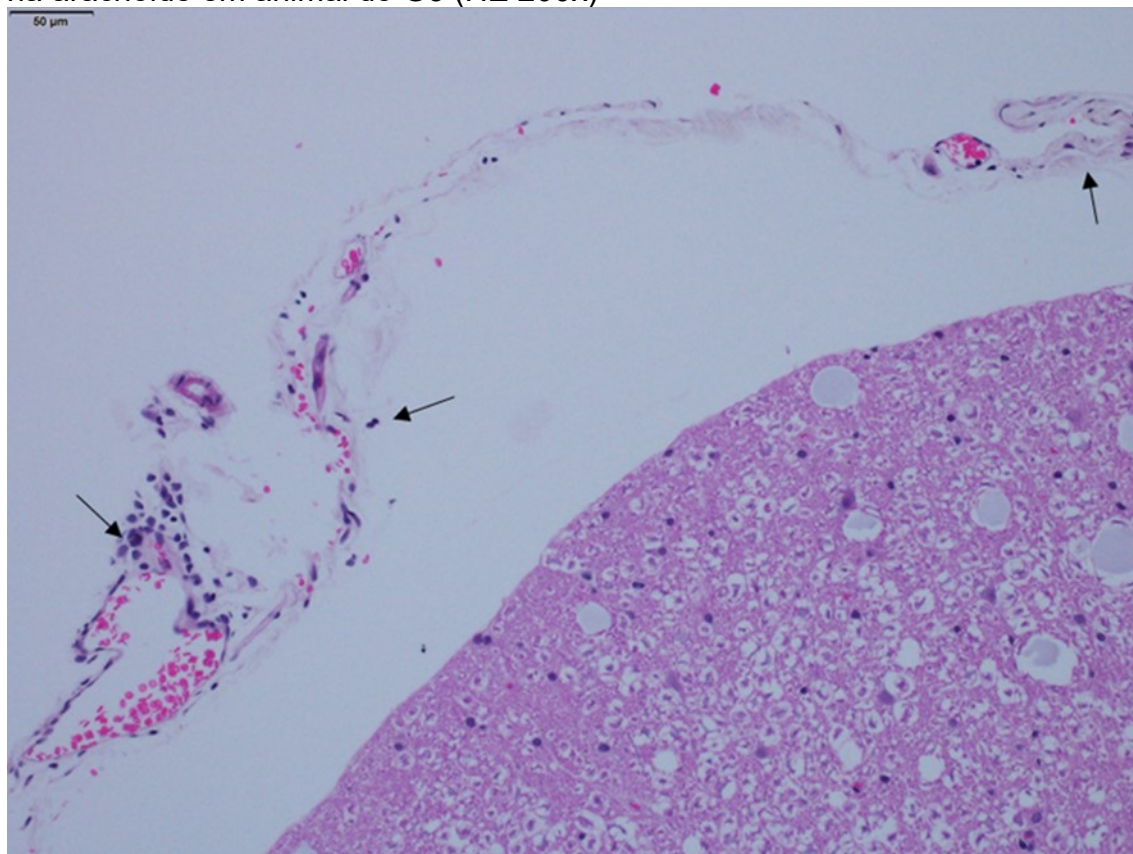


Figura 11 – Espessamento da pia-máter em animal do G3 (HE 200x)

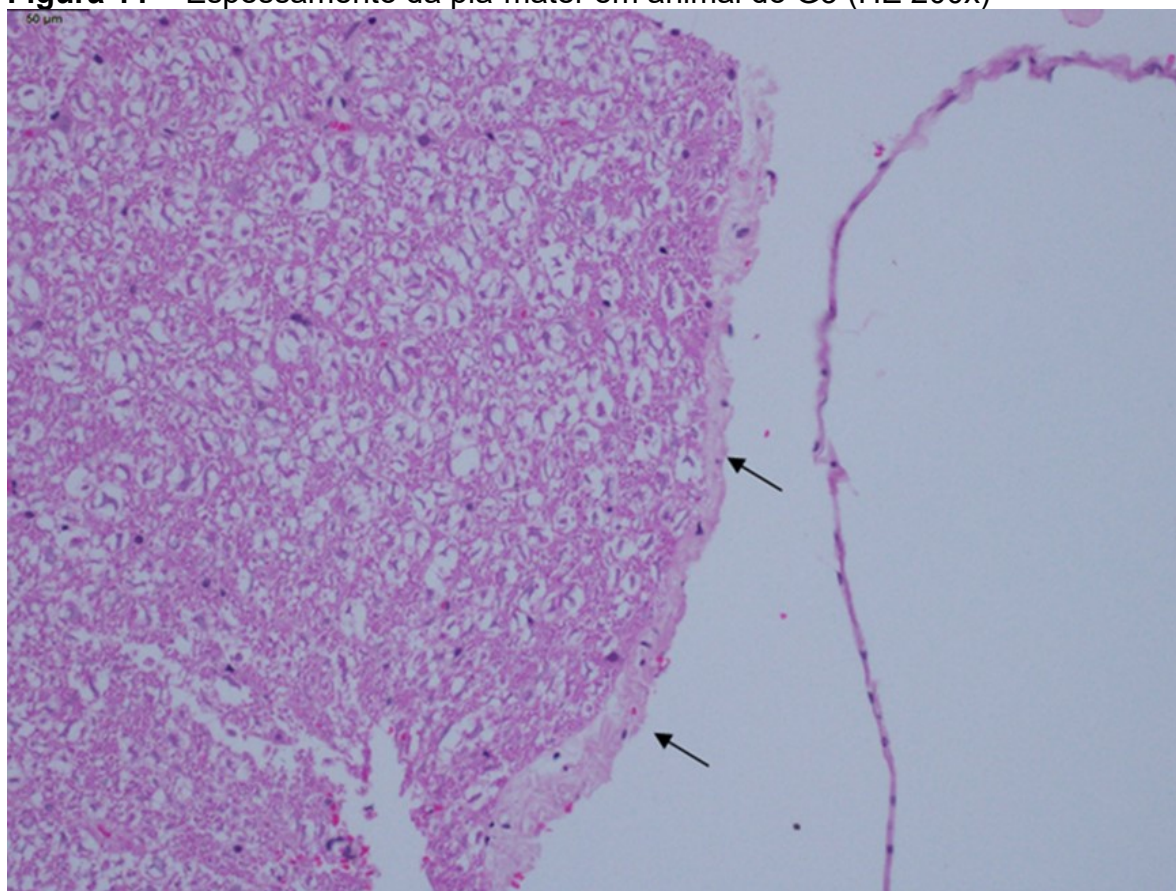
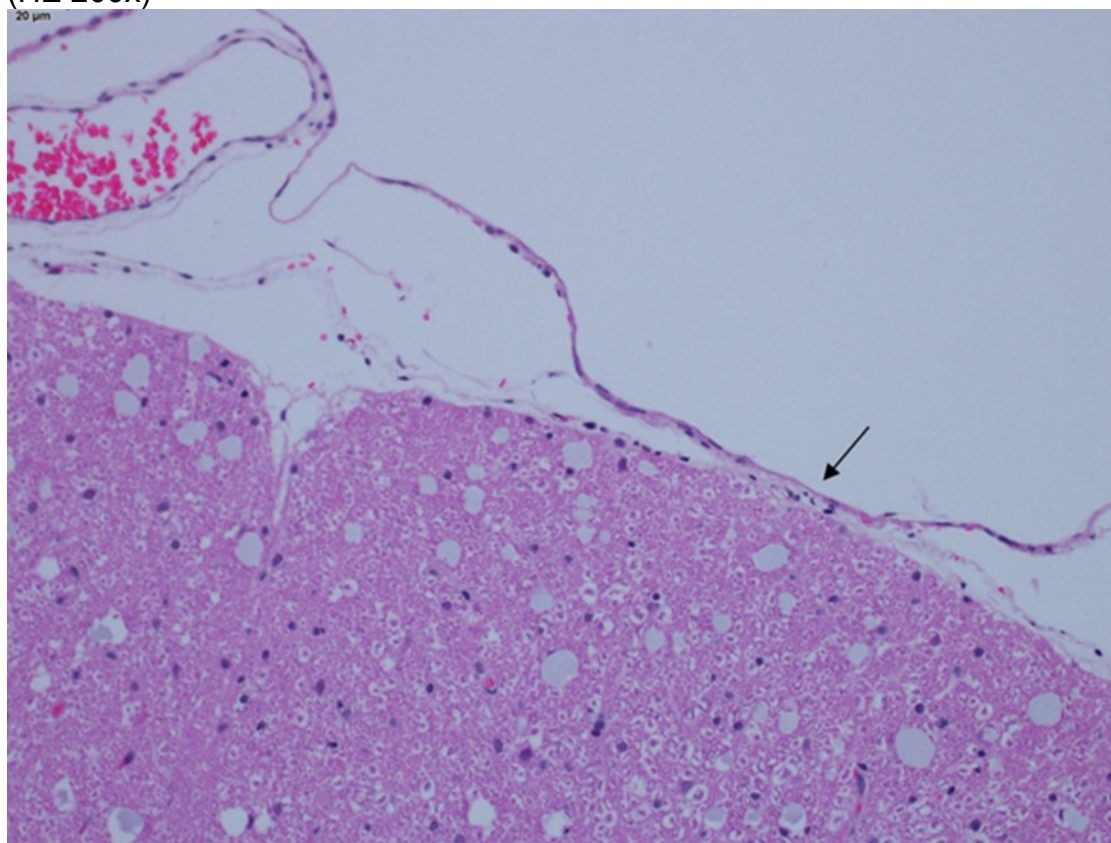


Figura 12 – Foco de aderência da pia-máter com aracnoide em animal do G3 (HE 200x)



6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a punção subaracnoidea através da pele tatuada desencadeia alterações inflamatórias agudas nas meninges com prevalência de infiltrado inflamatório linfocítico. Estas alterações evoluem para infiltrado inflamatório crônico com presença de plasmócitos⁵¹ associado a áreas de espessamento e focos de adesão entre a pia-máter e aracnoide após 360 dias, característicos de aracnoidite adesiva.⁵²

A aracnoidite adesiva possui quadro clínico complexo e diagnóstico difícil porque os sinais e sintomas não são específicos. No ser humano as características clínicas mais frequentes são a dor nas costas, que aumenta de intensidade com a atividade, a dor nas pernas, geralmente bilateral, a hiporreflexia, a diminuição da amplitude da movimentação do tronco, as alterações sensitivas, a dificuldade em manter as pernas elevadas e a disfunção do esfíncter urinário. Inicia-se como processo inflamatório da pia-máter e da aracnoide, associado ao edema e à hiperemia das raízes nervosas. Com a evolução da doença, faixas de colágeno começam a se formar entre a pia-máter, aracnoide e as raízes nervosas, culminando em aderência entre estas estruturas. Nesta fase o edema das raízes começa a diminuir.³⁶

A aracnoidite adesiva crônica é a resolução do processo inflamatório no qual se observa depósito denso de colágeno entre as raízes nervosas e as meninges. Há completo encapsulamento entre as raízes, levando a atrofia das mesmas e comprometimento dos vasos sanguíneos. Estudos histológicos mostraram vasos sanguíneos com arterite e discute-se se esta é a causa ou o resultado da aracnoidite. Alterações nas arteríolas, caracterizadas por inflamação e espessamento hialino, foram manifestações iniciais da aracnoidite adesiva desencadeada por contaminação da solução do anestésico local pelo antisséptico, em modelo experimental.⁵²

No presente estudo, a reação inflamatória iniciou-se ao redor dos vasos sanguíneos da meninge, porém sem que se observasse nenhum espessamento hialino nas arteríolas após 360 dias, que é característica comum na aracnoidite adesiva crônica.

Já havia sido observado, anteriormente, que a punção subaracnoidea sobre a pele tatuada determinava alterações histológicas meníngeas quando a análise dos tecidos havia sido realizada seis meses após a realização da punção raquidiana e que fragmentos de material permaneceram no interior da agulha independentemente da existência do estilete.²⁴

Assim sendo, pode se inferir que houve o contato de agente agressor com as meninges e este desencadeou resposta inflamatória local. Baseado nos achados deste estudo e de trabalho prévio é possível inferir que os pigmentos das tatuagens foram os agentes capazes de desencadear tal resposta.

Existe discussão frequente a respeito dos produtos químicos utilizados para produção dos pigmentos de tatuagem. Estes elementos foram sintetizados inicialmente para uso industrial e posteriormente adaptados para aplicação na pele. A composição dos corantes é variada e complexa com elementos orgânicos e inorgânicos, tal qual carbono preto, dióxido de titânio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos azo, mercúrio, alumínio, dentre outros, muitos sabidamente neurotóxicos e possivelmente cancerígenos.⁵³ Diversos elementos são ainda adicionados sob a forma de nanopartículas, o que torna a detecção do agente na mistura ainda mais difícil. Nos últimos anos, estudos tem demonstrado a habilidade dos pigmentos de migrarem para locais à distância (linfonodos)⁵⁴, bem como se degradarem em elementos com maior toxicidade e quimicamente mais reativos quando expostos à luz ou laser.^{55,56}

Apesar das alterações histológicas observadas nenhum animal do estudo apresentou déficits motor ou sensitivo. Este fato indica que o processo inflamatório, apesar de estabelecido, foi leve. É possível que embora a agulha utilizada para punção ter calibre maior do que a rotineiramente empregada na prática clínica (neste caso para facilitar a punção através da rígida pele do coelho), pequena quantidade de material tenha sido introduzida no espaço subaracnoideo, o que justificaria quadro inflamatório brando.

De particular interesse nota-se que embora tenha sido empregada mesma metodologia de estudo anterior, no qual 33% dos animais apresentaram inflamação linfoplasmocitária nas meninges seis meses após a punção da pele tatuada, no presente estudo, a avaliação histológica realizada 30 dias após a punção sobre a

pele tatuada, mostrou que o número de animais com inflamação linfocitária nos vasos das meninges foi superior (78,5%). Isto provavelmente se deve a mudança na técnica de execução da tatuagem, com deposição de maior quantidade de pigmento na pele, o que a torna mais comparável às tatuagens realizadas em seres humanos e confirma as relações existentes entre o pigmento, a inflamação e a lesão tecidual.

Com relação à aplicabilidade e relevância clínica deste modelo experimental coelhos possuem a pele mais grossa do que os seres humanos, todavia, esta diferença não interfere com os resultados uma vez que, histologicamente, ambas as espécies possuem a mesma estrutura biológica na epiderme e derme. Somando-se a isto, nos coelhos, muitas citocinas e enzima da pele são similares aos seres humanos, o que faz deste modelo animal o preferido para pesquisas em pele.⁵⁷ Biópsias de pele tatuada de voluntários mostram o mesmo padrão histológico das tatuagens realizadas nos coelhos deste estudo (figura 1), o que reforça os resultados obtidos.⁵⁸ Além disso, de acordo com estudo publicado na literatura, a reação inflamatória desencadeada pela introdução do pigmento de tatuagem na pele dos animais segue o mesmo padrão básico e comum em todas as espécies.⁵⁷

Uma possível limitação do presente estudo seria o fato de não ter sido encontrado pigmento vermelho nas lâminas histológicas dos coelhos do G2 e G3. Entretanto, é especulado que existe um movimento a partir dos vilos da aracnoide capaz de remover material estranho que é introduzido, inadvertidamente, no espaço subaracnoideo, sendo translocado e depositado no espaço peridural.^{59,60} Este pode ser um dos motivos de não ser observado pigmento nas lâminas estudadas. Todavia, outras pesquisas devem ser conduzidas para melhor elucidar este fato, e novas tecnologias devem ser desenvolvidas para detectar as nanopartículas dos pigmentos. A criação de modelos experimentais que permitam a introdução controlada de maior ou menor quantidade de pigmentos no espaço subaracnoideo é também essencial para avaliar sua associação com a intensidade da resposta inflamatória e possível manifestação clínica. Novos estudos devem incluir agulhas para realização de punção do tipo ponta de lápis, uma vez que estas são as mais comumente utilizadas na prática clínica para bloqueios de neuroeixo, em muitos países.^{61,62}

7 CONCLUSÃO

Neste estudo experimental em coelhos, a reação inflamatória nas meninges, desencadeada pela punção subaracnoidea através da pele tatuada, ocorre precocemente e evolui para aracnoidite adesiva.

8 Referências

1. Krutak L. The cultural heritage of tattooing: A brief history. *Curr Probl Dermatology*. 2015;48:1–5.
2. Schmid S. Tattoos - an historical essay. *Travel Med Infect Dis*. 2013;11:444–7.
3. Laumann AE, Derick AJ. Tattoos and body piercings in the United States: a national data set. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:413–21.
4. Renzoni A, Pirrera A, Novello F, Lepri A, Cammarata P, Tarantino C, et al. The tattooed population in Italy: a national survey on demography, characteristics and perception of health risks. *Ann Ist Super Sanita*. 2018;54:126–36.
5. Kluger N. Tattooed people, who are you? Demographic and behavioral characteristics of tattooed individuals. *Ann Dermatol Venereol*. 2015;142:410–20.
6. Douglas MJ, Swenerton JE. Epidural anesthesia in three parturients with lumbar tattoos: a review of possible implications. *Can J Anaesth*. 2002;49:1057–60.
7. Sleth J-C. Epidural anaesthesia and lumbar tattoo. Histology of tattoo: the missing link?. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2007;26:266–7.
8. Lea PJ, Pawlowski A. Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis. *Int J Dermatol*. 1987;26:453–8.
9. Goldstein AP. VII. Histologic reactions in tattoos. *J Dermatol Surg Oncol*. 1979;5:896–900.
10. Mann R, Klingmüller G. Electron-microscopic investigation of tattoos in rabbit skin. *Arch Dermatol Res*. 1981;271:367–72.
11. Fujita H, Nishii Y, Yamashita K, Kawamata S, Yoshikawa K. 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*. 1988;51:285–94.
12. Amann U, Luger TA, Metze D. Lichenoid pseudolymphomatous tattooing reaction. *Hautarzt*. 1997;48:410–3.
13. Chung W-H, Chang Y-C, Yang L-J, Hung S-I, Wong W-R, Lin J-Y, et al. Clinicopathologic features of skin reactions to temporary tattoos and analysis of possible causes. *Arch Dermatol*. 2002;138:88–92.

14. Le Coz CJ, Lefebvre C, Keller F, Grosshans E. Allergic contact dermatitis caused by skin painting (pseudotattooing) with black henna, a mixture of henna and p-phenylenediamine and its derivatives. *Arch Dermatol.* 2000;136:1515–7.
15. Long GE, Rickman LS. Infectious complications of tattoos. *Clin Infect Dis.* 1994;18:610–9.
16. Welliver D, Welliver M, Carroll T, James P. Lumbar epidural catheter placement in the presence of low back tattoos: a review of the safety concerns. *AANA J.* 2010;78:197–201.
17. Bendsoe N, Hansson C, Sterner O. Inflammatory reactions from organic pigments in red tattoos. *Acta Derm Venereol.* 1991;71:70–3.
18. Greve B, Chytry R, Raulin C. Contact dermatitis from red tattoo pigment (quinacridone) with secondary spread. *Contact Dermatitis.* 2003; 49:265–6.
19. Mortimer NJ, Chave TA, Johnston GA. Red tattoo reactions. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:508–10.
20. Houhoulis K, Lewis K, Fasone R, Benham BE. Tattoos and administration of regional anesthesia: a comprehensive systematic review protocol. *JBI database Syst Rev Implement reports.* 2016;14:48–63.
21. Zipori Y, Jakobi P, Solt I, Abecassis P. The need for an epidural “window of opportunity” in pregnant women with a lumbar tattoo. *Int J Obstet Anesth.* 2018;33:53–6.
22. Charlebois PA. Coring: the unseen menace. *Can Anaesth Soc J.* 1966;13:585–97.
23. Brandus V. The spinal needle as a carrier of foreign material. *Can Anaesth Soc J.* 1968;15:197–201.
24. Ferraz IL, Barros GAM de, Ferreira Neto PG, Solanki D, Marques MA, Machado VM de V, et al. Does Spinal Block Through Tattooed Skin Cause Histological Changes in Nervous Tissue and Meninges? *Reg Anesth Pain Med.* 2015;40:533–8.
25. Choremis C, Economos D, Gargoulas A, Papadatos C. Intraspinal epidermoid tumours (cholesteatomas) in patients treated for tuberculous meningitis. *Lancet.* 1956;271:437–9.
26. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine,

- bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg*. 2003;97:512–9.
27. Reina MA, López-García A, Dittmann M, de Andrés JA, Blázquez MG. Iatrogenic spinal epidermoid tumors. A late complication of spinal puncture. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 1996;43:142–6.
 28. McDonald J V, Klump TE. Intraspinal epidermoid tumors caused by lumbar puncture. *Arch Neurol*. 1986;43:936–9.
 29. Puolakka R, Andersson LC, Rosenberg PH. Microscopic analysis of three different spinal needle tips after experimental subarachnoid puncture. *Reg Anesth Pain Med*. 2000;25:163–9.
 30. Ozyurt G, Moğol EB, Tolunay S, Kerimoğlu B. Tissue coring with spinal needles. *Reg Anesth Pain Med*. 2000;25:665.
 31. Masson P, Rigot A, Cécile W. Brachial plexus neuropathy following pyogenic cervical adenophlegmon. *Arch Pediatr*. 1994;1:735–7.
 32. Beghi E, Kurland LT, Mulder DW, Nicolosi A. Brachial plexus neuropathy in the population of Rochester, Minnesota, 1970-1981. *Ann Neurol*. 1985; 18:320–3.
 33. Kuczkowski KM. Labour analgesia in a parturient with lumbar tattoo: a routine management? or not? *Can J Anaesth*. 2004;51:93.
 34. Mercier FJ, Bonnet M-P. Tattooing and various piercing: anaesthetic considerations. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009;22:436–41.
 35. Kluger N, Sleth J-C, Guillot B. Lumbar tattoos and lumbar puncture: the emperor's new clothes? *Can J Anaesth*. 2007;54:855.
 36. Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? I. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1983;8:538–40.
 37. Hutter CDD. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth*. 2004;92:902.
 38. Barros GAM de, Marques MEA, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over the dogs' spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras*. 2007;22:361–5.
 39. Lima RM, Navarro LH, Carness JM, Barros GA, Marques MEA, Solanki D, et al. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician*. 2010;13:493–501.
 40. Fukushima FB, Barros GAM, Marques MEA, Vidal EIO, Ganem EM. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth*

- Analg. 2009;109:965–71.
41. Sleth J-C, Guillot B, Kluger N. Lumbar tattoos and neuraxial anaesthesia in obstetrics: practice survey in Languedoc-Roussillon, France. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2010; 29:397–401.
 42. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC and DGA. Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments guidelines. 2010 [cited 2017 Aug 1]. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>
 43. Greenaway JB, Partlow GD, Gonsholt NL, Fisher KR. Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001;37:27–34.
 44. Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM, Dailey PA, Norton M, Curtis JD, et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg.* 1983;62:802–8.
 45. Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesth.* 1992;69:433–8.
 46. Jordan CR. Basic fundamentals of Modern tattoo. 1st ed. Avondale: AZ; 2009.
 47. Pereira IDF, Vital RB, Silva R, Valerini FG, Machado VM de V, Marques ME, et al. Ultrasound as a safe and reliable guidance for subarachnoid puncture in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2017;32:14–21.
 48. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology.* 1985;63:364–70.
 49. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology.* 1989;70:64–70.
 50. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16:109–10.
 51. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol.* 2017;18:826–31.
 52. HURST EW. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. *J Pathol Bacteriol.* 1955;70:167–78.
 53. Laux P, Tralau T, Tentschert J, Blume A, Dahouk S Al, Bäuml W, et al. A medical-toxicological view of tattooing. *Lancet.* 2016;387:395–402.

54. Schreiver I, Hesse B, Seim C, Castillo-Michel H, Villanova J, Laux P, et al. Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Sci Rep*. 2017;7:11395.
55. Schreiver I, Hutzler C, Andree S, Laux P, Luch A. Identification and hazard prediction of tattoo pigments by means of pyrolysis—gas chromatography/mass spectrometry. *Arch Toxicol*. 2016;90:1639–50.
56. Vasold R, Naarmann N, Ulrich H, Fischer D, König B, Landthaler M, et al. Tattoo pigments are cleaved by laser light-the chemical analysis in vitro provide evidence for hazardous compounds. *Photochem Photobiol*. 2004;80:185–90.
57. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9:111–8.
58. Pedrol JG, Trull JL, Sánchez MC, Romero JL, Martínez-Carpio PA, Trelles MA. Clinical observation of a professional tattooing procedure and evolutionary study of the skin damage provoked. *Photonics Lasers Med*. 2016;5:43-50.
59. Welch K, Pollay M. Perfusion of particles through arachnoid villi of the monkey. *Am J Physiol*. 1961;201:651–4.
60. Alksne JF, Lovings ET. The role of the arachnoid villus in the removal of red blood cells from the subarachnoid space. An electron microscope study in the dog. *J Neurosurg*. 1972;36:192–200.
61. S Lee, S Sandhu, Djulbegovic B, Mhaskar RS. Impact of spinal needle type on postdural puncture headache among women undergoing Cesarean section surgery under spinal anesthesia: A meta-analysis. *J Evid Based Med*. 2018;11(3):136-144.
62. Arevalo-Rodriguez I, Muñoz L, Godoy-Casasbuenas N, Ciapponi A, Arevalo JJ, Boogaard S, et al. Needle gauge and tip designs for preventing post-dural puncture headache (PDPH). *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;4:10807.

Apêndice

Can an inflammatory reaction in the meninges, caused by spinal puncture through tattooed skin, evolve into adhesive arachnoiditis? An experimental model in rabbits

Ronaldo Antonio da Silva, Isabela Leite Ferraz, Ricardo Santos Zuza, Camila Camara, Mariângela Alencar Marques, Vânia Maria de Vasconcelos Machado, Laís Helena Camacho Navarro, Guilherme Antônio Moreira de Barros, Eliana Marisa Ganem

Department of Anesthesiology,
Botucatu Medical School,
University of São Paulo State,
UNESP, São Paulo, Brazil

Correspondence to

Dr Ronaldo Antonio da Silva,
Botucatu Medical School,
University of São Paulo State,
UNESP, São Paulo, Brazil;
ronaldomed@hotmail.com

Interim data from this work was
presented at the Euroanesthesia
2018—European Society of
Anesthesiology in Denmark, 2
June 2018 to 4 June 2018.

Received 5 September 2018
Revised 9 October 2018
Accepted 28 October 2018

ABSTRACT

Background and objectives As the number of people with tattoos has been increasing, anesthesiologists are more and more faced with the decision to perform a neuraxial blockage through tattooed skin. In this study, we evaluated the possibility of puncture through tattooed skin determines acute inflammatory changes in the meninges and spinal cord and later evolve into adhesive arachnoiditis.

Method Forty-two male rabbits were randomized into 3 groups of 14: G1, spinal puncture through non-tattooed skin and saline solution injection; G2, spinal puncture through tattooed skin and saline solution injection, captive for 30 days; G3, spinal puncture through tattooed skin and saline solution injection, captive for 360 days. The animals were anesthetized and ultrasound-guided spinal puncture was performed in the intervertebral spaces between S1 – S2. During the period of captivity, the animals were clinically assessed for sensitivity and motor function. After that, they were sacrificed and the lumbosacral portion of the spinal cord was excised for histological analysis.

Results No histological changes were found on group 1. Eleven animals from group two presented with foci of perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in the pia mater and/or arachnoid. In Group 3, eight rabbits presented with inflammatory changes in the meninges, which were associated with thickening and/or adhesion of the pia mater and arachnoid in some cases and five rabbits presented only thickening of pia-mater.

Conclusions Spinal puncture through tattooed skin of rabbits can trigger acute inflammatory changes in the meninges and after a prolonged period of observation evolve into adhesive arachnoiditis.

to perform neuraxial blockage, especially in situations such as obstetrics, because of limited scientific evidence regarding safety of the practice.^{6,7}

In rabbits, the occurrence of inflammatory changes in the meninges and spinal cord 6 months after the completion of a spinal puncture through tattooed skin was observed and was associated with the presence of fragments of ink on the needle.⁸

The above-mentioned findings raised the question of occurrence of such changes at an earlier time (30 days) after inadvertent introduction of the pigment during intrathecal puncture through tattooed skin and the probability of development of adhesive arachnoiditis after a longer observation period (360 days).

METHODS

The study followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments guidelines and the Brazilian Directive for care and use of animals for scientific purposes and teaching—DBCA.

A total of 45 young adult male rabbits from the Botucatu Genetic Group breed, weighing between 3300 g and 5400 g, with spinal cord length (measured from the base of the skull to the lumbosacral space)⁹ between 38 cm and 41 cm were included in the study. The Animal House at Botucatu Medical School provided the rabbits.

Rabbits that did not exhibit a healthy appearance were not included. Seriously ill rabbits and/or those that died during the captivity period were excluded, as well as those who needed more than one spinal puncture and/or traumatic puncture.

Forty-two animals were randomized, using a computer-generated list and opaque envelopes, into three experimental groups, with 14 animals in each, as:

- ▶ G1: rabbits without tattoo—spinal puncture, injection of 0.9% saline solution, and captive for 30 days.
- ▶ G2: rabbits with tattoo, spinal puncture, injection of 0.9% saline solution, and captive for 30 days.
- ▶ G3: rabbits with tattoo, spinal puncture, injection of 0.9% saline solution, and captive for 360 days.

INTRODUCTION

Body tattooing is a common practice since the dawn of civilization, with ceremonial, religious, tribal and esthetic connotations for both individuals and societies.^{1,2} In recent decades, tattoos have gained popularity due to pop culture, making them a global object of desire, especially among young adults.^{3–5}

Owing to the new trend of tattooing, anesthesiologists are increasingly faced with the decision



© American Society of Regional
Anesthesia & Pain Medicine
2019. No commercial re-use.
See rights and permissions.
Published by BMJ.

To cite: da Silva RA,
Ferraz IL, Zuza RS, et al.
Reg Anesth Pain Med Epub
ahead of print: [please
include Day Month Year].
doi:10.1136/rapm-2018-
100085

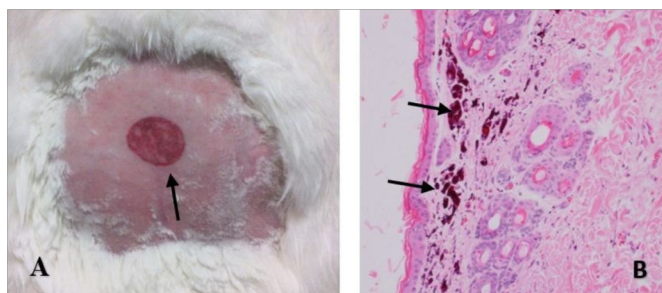


Figure 1 (A) Final aspect of the tattoo in the sacral region of the rabbit after 30 days of the skin procedure (arrow). (B) Pigment in the dermoepidermal junction, encapsulated by fibroblasts, 30 days after tattooing. H&E staining, 100× magnification.

Through G1, we aimed at evaluating the possible effects of the volume of the administered solution in a very small intrathecal space, since sudden increases in cerebrospinal fluid pressure can compromise spinal cord blood flow, causing ischemia and neurological injury,¹⁰ as well as excluding possible intraneural injection of the solution, using ultrasound, once a little volume like 0.05 mL can trigger degeneration in the peripheral nerve of the rabbit.¹¹

The remaining three rabbits that were not allocated in any group were tattooed, and after 30 days, a skin biopsy at the center of the tattoo was taken to evaluate the tissue characteristics (figure 1).^{12 13}

The experiment was divided into four phases: (1) tattooing protocol, (2) spinal puncture protocol, (3) period of clinical observation, and (4) preparation of the sections and histological evaluation.

Tattooing protocol (phase 1)

An area of 10 cm around the intervertebral spaces S1–S2 was washed with soap and water, the hair was removed, and chlorhexidine gluconate was used for skin antisepsis. An approximately 2 cm diameter tattoo was made by a professional tattoo artist, using a 3 RL needle (BlacklineGold) and a red pigment ink (Electric Ink),¹⁴ at an angle of 45° in order to guarantee higher pigment deposition, ideally at the dermoepidermal junction with minimal local inflammation.¹⁵

All animals were anesthetized with intravenous xylazine (3 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg).

Spinal puncture protocol (phase 2)

Washing, antiseptic and anesthesia procedure as previously described were repeated at this stage. After that, one single spinal puncture was performed 30 days after tattooing in each animal from G2 and G3 and in an area not tattooed in each animal from G1.

All spinal punctures were performed by the same researcher, proficient in the technique, using a Sonosite Ultrasonography device, M-turbo model, with Tissue Doppler Imaging and linear transducer at 10 MHz. A 22-gage Quincke point needle was used and after the identification of the yellow ligament, the needle was guided, 45° to the skin, under ultrasonography vision. When the subarachnoid space was identified,¹⁶ 0.2 mL of saline solution was injected.^{17 18}

Period of clinical observation (phase 3)

The animals were evaluated 1 hour after the spinal puncture and once daily for 30 days (G1 and G2) and 360 days (G3). In each

animal, motor deficit was assessed based on the Drummond and Moore scale.¹⁹

- ▶ 0—paralysis of lower extremities.
- ▶ 1—inability to support the body through the lower extremities.
- ▶ 2—asymmetry and limitation to support the body and walk through the lower extremities.
- ▶ 3—normal movement of the lower extremities.

The response to nociception was assessed by pinching the upper and lower extremities with surgical tweezers. The skin of the thoracic, sacral, lumbar vertebrae and ear dermatomes was tested too, and paw withdrawal, vocalization, and facial expression of the rabbits were then observed, which were then classified as either absent or present. All tests were performed according to the guidelines of the International Association for the Study of Pain.²⁰

Preparation of sections and histological evaluation (phase 4)

After the observation period, the animals were anesthetized with intravenous xylazine and ketamine and sacrificed by decapitation.

The lumbosacral spinal cord was excised in less than 3 min following decapitation and fixed in 10% formalin solution to avoid tissue damage by ischemia or apoptosis. After a 7-day incubation period, nerve tissue cuts were performed at 1 cm intervals, starting 10 cm above the level of the puncture to the end of the cauda equina. The staining technique used for the histological slides was H&E.

Three researchers, members of the research group in neurotoxicity at the Botucatu Medical School, were blinded to the study protocol and rated the histological sections for the presence or absence of nerve injury, describing the severity and extent based on the following predefined criteria:

- a. Type of lesion: 1=arachnoiditis, 2=arachnoiditis+spinal cord injury, 3=spinal cord injury.
- b. Location of lesion: 1=dorsal, 2=lateral, 3=ventral.
- c. Extension of lesion in the histological section: 1, <10%; 2, >10% and <50%; 3, >50%.
- d. Depth of lesion: 1=white matter (B), 2=gray matter (C), 3=white+gray matter (B+C).
- e. Blood vessels: 1=normal, 2=wall thickening, 3=thrombosis.

The sample size was calculated according to Fleiss *et al.*²¹ Assuming that injury was 0% in the puncture group without tattooing, a test power equal to 0.80 and a type I error of 0.05, it was estimated that 14 rabbits per group would be needed to detect statistically significant differences equal to or greater than 5% of the lesion.

In order to evaluate the homogeneity of the groups with respect to the weight and length of the spinal cord, we calculated the mean and SD.

RESULTS

No animals were excluded from the study. The groups (14 rabbits per group) were homogeneous with respect to the weight and cord length of the animals.

None of the 42 rabbits, regardless of the group or phase of the study, had motor changes based on the Drummond and Moore scale as well as sensitive alterations according to the sensitivity assessment tests.

In group 1 animals, no histological changes were found in nerve tissue, meninges, and blood vessels (figure 2).

Eleven animals from group 2 (78.5%; $p < 0.05$) had foci of perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in the pia mater and/or arachnoid (figure 3; table 1).

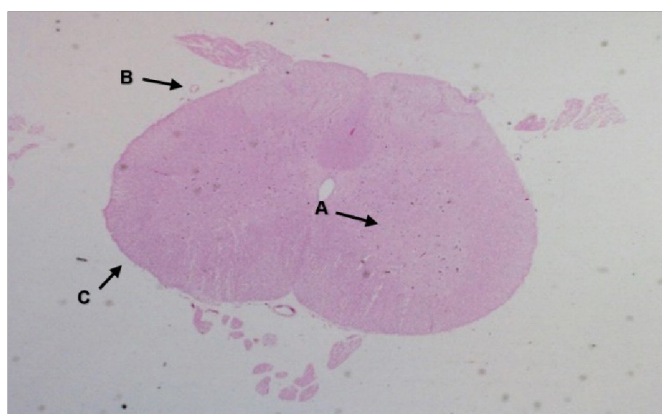


Figure 2 (A) Normal nervous tissue, (B) normal blood vessels, and (C) normal meninges of a G1 animal. H&E staining, 40× magnification.

In group 3, 13 rabbits (92.8%; $p < 0.05$), presented with changes in the meninge: eight rabbits with inflammatory lymphocytic or perivascular lymphoplasmacytic infiltrate in the meninges (figure 4; table 2), which were associated with thickening and/or adhesion of the pia mater and arachnoid in some cases (figure 5B) and five rabbits presented only thickening of pia mater (figure 5A; table 2).

DISCUSSION

The results of the present study showed that spinal puncture through tattooed skin triggered acute meningeal inflammatory changes with prevalence of lymphocytic infiltrate after 30 days. These changes evolved as chronic inflammatory infiltration, with the presence of plasma cells,²² associated with areas of thickening and foci of adhesion between the pia mater and arachnoid after 360 days, which are characteristic features of adhesive arachnoiditis.²³ A previous study had reported histological meningeal changes after spinal puncture on tattooed skin, when analysis of the tissues was conducted 6 months after completion of spinal puncture. The study also reported that fragments of material (pigment) remained inside the needle despite the use of a needle with a stylet.⁸

There are frequent ongoing discussions on the chemicals used for production of tattoo pigments. The chemicals used were

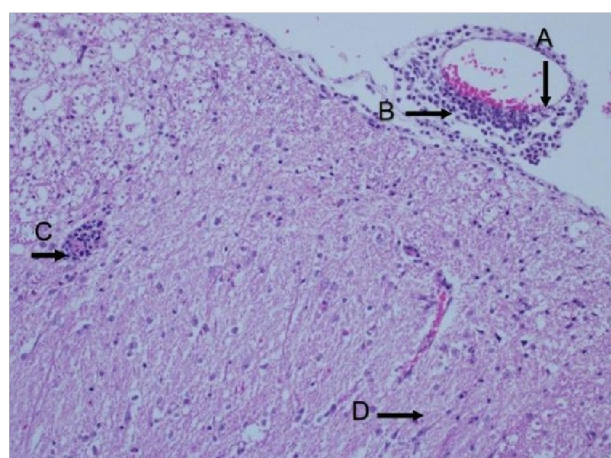


Figure 3 Focus of perivascular inflammatory infiltrate in the pia mater in the (A and B) posterior region of the spinal cord, (C) perivascular intraparenchymal, (D) normal nerve tissue in a G2 rabbit. H&E staining, 200× magnification.

Table 1 Histological characteristics of the animals belonging to G2 during review of the sections

Rabbits	Fibrous thickening	Inflammatory infiltration	Trabeculae formation (adherence among pia, arachnoid, and dura mater)	Spinal cord—necrosis
1	Absent	Absent	Absent	Absent
2	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater, posterior region, <10%	Absent	Absent
3	Absent	Absent	Absent	Absent
4	Absent	Absent	Absent	Absent
5	Absent	Foci of perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in pia mater and arachnoid, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
6	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater and arachnoid, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
7	Absent	Perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate foci in arachnoid, posterior region, <10%	Absent	Absent
8	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater and arachnoid, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
9	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater and arachnoid, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
10	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater, region posterior, <10%	Absent	Absent
11	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic in the pia mater, posterior region, <10%	Absent	Absent
12	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater, posterior region, <10%	Absent	Absent
13	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic infiltrate in the pia mater, posterior region, <10%	Absent	Absent
14	Absent	Inflammatory foci of perivascular lymphocytic in the pia mater, posterior region, <10%	Absent	Absent

synthesized initially for the industrial use and later adapted for application to the human dermis. The composition of the dyes is varied and complex, with organic and inorganic elements, such as black carbon, titanium dioxide, polycyclic aromatic hydrocarbons, azo dyes, mercury, and aluminum, most being known neurotoxic and potentially carcinogenic agents.²⁴ Many elements

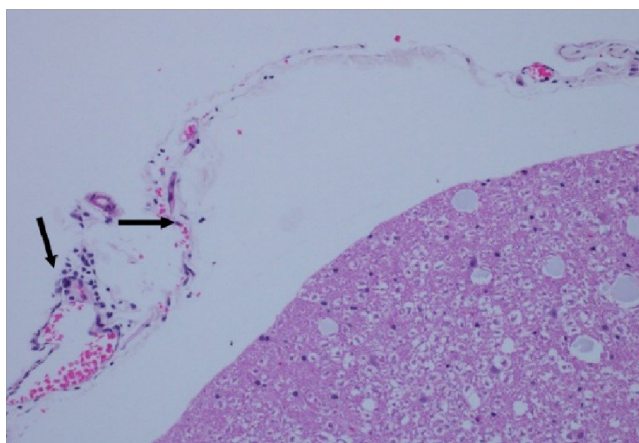


Figure 4 Perivascular lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in the pia mater and arachnoid in a G3 rabbit (arrows). H&E staining, 200× magnification.

were further added in the form of nanoparticles, which makes detection of the toxic agent in the blend more challenging every day. Recent studies have demonstrated the ability of pigments to migrate to distant sites (lymph node),²⁵ as well as degrade into more toxic and reactive elements when exposed to sunlight or laser.^{26,27}

Thus, it can be inferred that the pigments used are capable of triggering an inflammatory response and tissue damage. Red pigment was used in the present study as it has been shown to be associated with greater number of complications and delayed reactions.²⁸

In spite of the histological alterations, no animal studied showed motor and/or sensory deficits. This fact indicates that the inflammatory process, although established, was mild since hyaline thickening in the arterioles was not observed, a characteristic sign of chronic adhesive arachnoiditis where there is complete encapsulation of the nerve roots and exuberant clinical picture.²³ The small amount of material introduced into the subarachnoid space, although the needle used to perform the puncture (Quincke, 22 G) was larger than that routinely used in clinical practice (in this case, to facilitate puncture of the rigid skin of rabbits), may be one of the reasons for mild inflammation and the absence of symptomatology.

Regarding to applicability and clinical relevance of this experimental model, rabbits have the skin thicker than humans. This difference, however, does not interfere with the results since, histologically, both species have the same biological structure in the epidermis and dermis.²⁹ Moreover, in rabbits, many skin cytokines and enzymes are similar to humans. Accordingly, this animal model is often preferred during skin research.²⁹ Biopsies of tattooed skin of volunteers³⁰ show the same histological pattern of tattoos performed on the animals of the present study (figure 1B), which reinforces the results found. In addition, according to the literature, the inflammatory reaction triggered by the introduction of pigment into the skin of the animals follows the same basic pattern in all species.²⁹

A limitation of the present study is the fact that no ink pigments were found in the meninges of rabbits in G2 and G3. Further research must be conducted to better elucidate this issue, and newer technologies must be developed to detect nanoparticles of pigments. Creation of experimental models that allow the controlled introduction of a greater or lesser amount of pigment is essential to evaluate its association with the intensity of the inflammatory response and possible clinical manifestations.

Table 2 Histological characteristics of animals belonging to G3 during review of the sections

Rabbits	Fibrous thickening	Inflammatory infiltration	Trabeculae formation (adherence among pia, arachnoid, and dura Mater)	Spinal cord—necrosis
1	Absent	Perivascular lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in the pia mater and arachnoid, anterior, posterior and lateral region, <10%	Absent	Absent
2	Thickening of pia mater and arachnoid	Perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in the pia mater and arachnoid, anterior, posterior and lateral region, <10%	Adherence of pia mater and arachnoid	Absent
3	Thickening foci of the pia mater	Absent	Absent	Absent
4	Absent	Perivascular lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in the pia mater and arachnoid, posterior region, <10%	Absent	Absent
5	Thickening of pia mater	Perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate, posterior region, <10%	Adherence of pia mater and arachnoid	Absent
6	Thickening foci of the pia mater	Lymphocytic inflammatory infiltrate, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
7	Thickening foci of the pia mater	Lymphocytic inflammatory infiltrate foci, posterior region, <10%	Absent	Absent
8	Thickening foci of the pia mater	Absent	Absent	Absent
9	Thickening foci of the pia mater	Absent	Absent	Absent
10	Thickening foci of the pia mater	Lymphocytic inflammatory infiltrate, anterior, lateral and posterior region, <10%	Absent	Absent
11	Thickening foci of the pia mater	Lymphocytic inflammatory infiltrate, posterior region, <10%	Absent	Absent
12	Absent	Absent	Absent	Absent
13	Thickening foci of the pia mater	Absent	Absent	Absent
14	Thickening foci of the pia mater	Absent	Absent	Absent

Other studies should also include a pencil—point type of spinal needle since this is more commonly used for spinal injections in many countries.

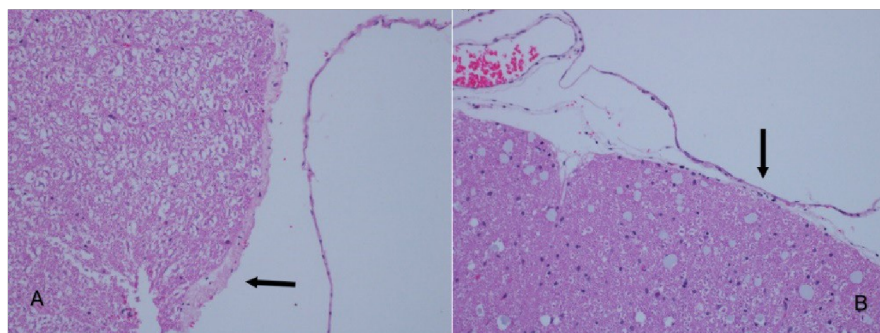


Figure 5 (A) Thickening of the pia mater in a G3 rabbit (arrow). (B) Focus of adhesion of pia mater with arachnoid in a G3 rabbit (arrow). H&E staining, 200× magnification.

In conclusion, the results of the present study show that intrathecal puncture through tattooed skin of rabbits in this experimental model can trigger acute inflammatory changes in meninges and, after a prolonged observation period (360 days), evolve into changes suggestive of adhesive arachnoiditis.

Additionally, we restate that tattooed areas should be avoided in neuraxial blockage in order to minimize possible complications for patients, until further studies can clarify the existing uncertainties

Contributors RAdS, ILF, and EMG contributed to the conception and design of study. RAdS, ILF, CC, and RSZ contributed to the acquisition of data. RAdS, MM, VMdM, and EMG contributed to the analysis and/or interpretation of data. RAdS, LHCN, GAMdB, and EMG drafted the manuscript. RAdS and EMG revised the manuscript.

Funding This work received funding from the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2015-2/140454) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 2015/054688-6).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The Botucatu Medical School Ethics Committee on Animal Experiments (Certificate 1151/2015 CEUA).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Krutak L. The cultural heritage of tattooing: a brief history. *Curr Probl Dermatol* 2015;48:1–5.
- Schmid S. Tattoos – an historical essay. *Travel Med Infect Dis* 2013;11:444–7.
- Laumann AE, Derick AJ. Tattoos and body piercings in the United States: a national data set. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:413–21.
- Renzoni A, Pirrera A, Novello F, et al. The tattooed population in Italy: a national survey on demography, characteristics and perception of health risks. *Ann Ist Super Sanita* 2018;54:126–36.
- Kluger N, people T. who are you? Demographic and behavioral characteristics of tattooed individuals [in French]. *Ann Dermatol Venereol* 2015;142:410–20.
- Houhouliis K, Lewis K, Fasone R. Tattoos and administration of regional anesthesia: a comprehensive systematic review protocol. *JB1 database Syst Rev Implement reports* 2016;14:48–63.
- Zipori Y, Jakobi P, Solt I, et al. The need for an epidural “window of opportunity” in pregnant women with a lumbar tattoo. *Int J Obstet Anesth* 2018;33:53–6.
- Ferraz IL, Barros GA, Ferreira Neto PG, et al. Does spinal block through tattooed skin cause histological changes in nervous tissue and meninges?: An experimental model in rabbits. *Reg Anesth Pain Med* 2015;40:533–8.
- Greenaway JB, Partlow GD, Gonsholt NL, et al. Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits. *J Am Anim Hosp Assoc* 2001;37:27–34.
- Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM, et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg* 1983;62:802–8.
- Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesth* 1992;69:433–8.
- Lea PJ, Pawlowski A. Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis. *Int J Dermatol* 1987;26:453–8.
- Mann R, Klingmüller G. Electron-microscopic investigation of tattoos in rabbit skin. *Arch Dermatol Res* 1981;271:367–72.
- Mortimer NJ, Chave TA, Johnston GA. Red tattoo reactions. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:508–10.
- Jordan CR. *Basic fundamentals of modern tattoo*. Avondale, AZ: TBO LLC Publishing Company, 2009.
- Pereira ID, Vital RB, Silva R, et al. Ultrasound as a safe and reliable guidance for subarachnoid puncture in rabbits. *Acta Cir Bras* 2017;32:14–21.
- Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, et al. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology* 1985;63:358–70.
- Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, et al. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg* 2003;97:512–9.
- Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 1989;70:64–70.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.
- Fleiss J, Levin B, Paik M. *Statistical methods for rates and proportions*. 3rd edn. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2003.
- Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, et al. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol* 2017;18:826–31.
- Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? *Spine* 1983;8:538–40.
- Laux P, Tralau T, Tentschert J, et al. A medical-toxicological view of tattooing. *The Lancet* 2016;387:395–402.
- Schreiber I, Hesse B, Seim C, et al. Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Sci Rep* 2017;7:11395.
- Schreiber I, Hutzler C, Andree S, et al. Identification and hazard prediction of tattoo pigments by means of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Arch Toxicol* 2016;90:1639–50.
- Vasold R, Naarmann N, Ulrich H, et al. Tattoo pigments are cleaved by laser light – the chemical analysis in vitro provide evidence for hazardous compounds. *Photochem Photobiol* 2004;80:185–90.
- Bendsoe N, Hansson C, Sterner O. Inflammatory reactions from organic pigments in red tattoos. *Acta Derm Venereol* 1991;71:70–3.
- Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 2012;9:111–8.
- Pedrol JG, Trull JL, Sánchez MC, et al. Clinical observation of a professional tattooing procedure and evolutionary study of the skin damage provoked. *Photonics Lasers Med* 2016;5:43–50.