



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Isabela Leite Ferraz Cabral

**São precoces as alterações histológicas meníngeas
desencadeadas pela introdução do pigmento da
tatuagem após punção subaracnoidea?**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Marisa Ganem

Botucatu

2018

Isabela Leite Ferraz Cabral

**São precoces as alterações histológicas meníngeas
desencadeadas pela introdução do pigmento da
tatuagem após punção subaracnoidea?**

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

Orientadora: Profa.Dra. Eliana Marisa Ganem

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cabral, Isabela Leite Ferraz.

São precoces as alterações histológicas meningeas desencadeadas pela introdução do pigmento da tatuagem após punção subaracnoidea? / Isabela Leite Ferraz Cabral.
- Botucatu, 2018

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

Orientador: Eliana Marisa Ganem
Capes: 40102130

1. Coelho como animal de laboratório. 2. Toxicologia.
3. Anestésicos - Complicações. 3. Tatuagem. 4. Meninges.

Palavras-chave: Coelhos; Complicações; Injeção
subaracnoidea; Tatuagem.

Dedicatória

Aos meus pais, José Ferraz e Maria Carmelita, pelo amor que traz segurança, força, paz e equilíbrio para a minha vida.

À minha irmã, Maria Cristina, por acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente.

Ao meu esposo, Lucas, por estar sempre ao meu lado me apoiando, me dando orgulho e me fazendo crescer e ser feliz.

À minha filha, Luísa, pelo amor que me transforma e me torna capaz de qualquer coisa.

Agradecimento Especial

À Profa. Dra. Eliana Marisa Ganem

Minha querida orientadora, de mente brilhante, cheia de ideias, que me conduziu com tanto amor a participar das mesmas, orientando para ciência e para a vida.

Sou feliz por ter tido a oportunidade de aprender muito com ela e, mais ainda, por tê-la presente na minha vida.

A ela, todo o meu carinho, respeito, admiração e gratidão.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Laís Helena Navarro e Lima, pela amizade e pelas orientações fundamentais tanto na minha vida profissional como pessoal.

A todos os docentes do Departamento de Anestesiologia de Botucatu e, em especial, à Dra. Yara Marcondes Machado Castiglia pelo apoio durante a pós-graduação e ao Dr. Pedro Thadeu Galvão Vianna pela sua importância para a idealização deste trabalho.

Aos meus colegas de residência, que fazem parte das minhas melhores lembranças, em especial, à Ana Lygia Rochitti de Carvalho, pelo carinho e atenção.

Aos funcionários da secretaria e serviço de computação do Departamento de Anestesiologia de Botucatu, Joana e André, pelo carinho e ajuda na digitação final do texto, Neli e Sônia, pelas orientações e disponibilidade.

À Profa. Dra. Vania Maria de Vasconcelos Machado, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio com a ultrassonografia.

À Profa. 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, pelo carinho, paciência e presteza fundamentais ao longo desta jornada.

À FAPESP, pelo auxílio pesquisa (Processo 140454/2015-2), pela concessão de bolsa de iniciação científica (Processo 2015/054688-6) e à graduanda Camila Camara Viviani dos Santos, pela ajuda na execução do trabalho.

RESUMO

Cabral ILF. São precoces as alterações histológicas meníngeas desencadeadas pela introdução do pigmento da tatuagem após punção subaracnoidea? [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2018.

Justificativa e objetivo: o hábito de tatuar o corpo faz parte da cultura de muitos povos no mundo. A partir do início dos anos 1990, passou a ser utilizada por alguns grupos sociais e em faixa etária determinada como uma forma de arte no corpo. Os pigmentos podem conter componentes orgânicos e inorgânicos, metais e solventes. Há grande variação na composição química destes, o que dá origem às diferentes cores. Pouco se conhece sobre as possíveis implicações da introdução de uma agulha para realização de anestesia regional sobre uma pele tatuada. Alguns autores questionam se o pigmento contido na tatuagem pode desencadear aracnoidite química. Estudo experimental determinou infiltrado inflamatório linfoplasmacitário perivascular nas meninges de coelhos, 6 meses após punção subaracnoidea sobre pele tatuada. O objetivo desta pesquisa foi avaliar se a punção subaracnoidea realizada sobre a pele tatuada de coelhos ocasiona alterações histológicas precoces nas meninges. **Material e Métodos:** após a aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa no Uso de Animais, foram utilizados 28 coelhos adultos jovens, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3300 e 5400g e comprimento de medula espinal (espaço medido entre a base do crânio e o espaço lombossacral) entre 38 e 41 cm, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram divididos em 2 grupos (G): G1- punção subaracnoidea sobre tatuagem e injeção de solução salina a 0,9% e G2 - punção subaracnoidea sobre pele não tatuada e injeção de solução salina a 0,9%. Após anestesia venosa com xilazina e cetamina, os animais de G1 foram tatuados e, após 30 dias, sob a mesma anestesia, foi realizada a abordagem do espaço subaracnoideo, com agulha de Quincke 22G 21/2", no espaço intervertebral entre a primeira e a segunda vértebra sacral, guiada por

ultrassom. Os animais de G1 e G2 receberam as soluções correspondentes em volume de 5 µL por centímetro de medula espinal (aproximadamente 0,2 mL). Os animais foram avaliados clinicamente quanto à sensibilidade e à motricidade por 30 dias, após os quais foram sacrificados e retiradas as porções lombar e sacral da medula espinal para exame histológico por microscopia óptica. **Resultados:** onze animais (78,6%) de G1 apresentaram lesões histológicas focais na pia-máter e aracnoide. Nos animais de G2 não foram encontradas alterações histológicas no tecido nervoso, nos vasos sanguíneos ou nas meninges. **Conclusão:** são precoces as alterações histológicas meníngeas desencadeadas pela introdução do pigmento da tatuagem após punção subaracnoidea.

Palavras-Chave: Coelho; Medula espinal; Neurotoxicidade; Pigmento da tatuagem; Punção subaracnoidea; Toxicidade meníngea.

ABSTRACT

Cabral ILF. Do meningeal histological changes produced by the introduction of the tattoo pigment after subarachnoid puncture develop early? [Ph.D. thesis]. Botucatu: Medical School (Unesp); 2018.

Background: body tattooing is cultural for many people around the world. Since the early 1990s, it began to be used by some social groups and some age groups as a body art. The pigments may contain organic and inorganic components, metals and solvents. There is a great variation in the chemical composition of these pigments and that is why they produce different colors. We don't know the possible implications of introducing a needle for performing regional anesthesia on a tattooed skin. Some authors question whether the pigment contained in the tattoo can trigger chemical arachnoiditis. One experimental study showed perivascular lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate in rabbit meninges, 6 months after subarachnoid puncture on tattooed skin. The aim of this study was to evaluate if the subarachnoid puncture performed on the tattooed skin of rabbits already causes early histological changes in the meninges. **Material and Methods:** after Ethics Committee's approval, it was used 28 young adult rabbits from Botucatu's genetic group. The rabbits weights were between 3000 and 4500g and the length of spine (space measured from the base of the skull to lumbosacral space) were between 38 and 41 cm provided by the Medical Center of Botucatu Medical School. The animals were divided into 2 groups (G): in G1 group there was a subarachnoid puncture on tattooing and injection of 0.9% saline solution while in G2 group there was a subarachnoid puncture on non-tattooed skin and injection of 0.9% saline solution. After venous anesthesia with xylazine and ketamine, the G1 animals were tattooed. After 30 days, under the same anesthesia, the subarachnoid space were accessed, with Quincke's Needle 22G 21/2", in the intervertebral space between the first and second sacral vertebra. All the procedure was ultrasound guided. The rabbits of G1 and G2 groups received the corresponding volume solutions of 5 µl per centimeter of spinal cord

(approximately 0.2 mL). The animals were clinically assessed for sensitivity and motor function for 30 days. After that, they were sacrificed and the lumbar and sacral portions of the spinal cord were removed for histological examination by light microscopy. **Results:** eleven animals (78.6%) of G1 group had focal histological lesions in the pia mater and arachnoid. No histological changes were found in nervous tissue, blood vessels or meninges on G2 group. **Conclusions:** early meningeal histological changes are triggered by introduction of tattoo pigment into central nervous system after subarachnoid puncture.

Keywords: Rabbit; Spinal cord; Neurotoxicity; Tattoo pigment; Subarachnoid puncture; Meningeal toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pele de coelho imediatamente após ser tatuado.....	26
Figura 2	Pele de coelho 30 dias após a tatuagem.....	26
Figura 3	Organograma da avaliação histológica.....	33
Figura 4	Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter, região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D), espaço de Virchow-Robin (E) e tecido nervoso normal (A) de animal do G1. HE 100x.....	38
Figura 5	Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter, na região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D) e tecido nervoso normal (A) de animal do G1. HE 200x.....	38
Figura 6	Foco de infiltrado inflamatório linfocitário na pia-máter e aracnoide (C) de animal do G1. HE 100.....	39
Figura 7	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G2.....	39

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Características histológicas dos animais pertencentes ao G1.....	37
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	HIPÓTESE.....	19
3	OBJETIVO.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Animais utilizados.....	24
4.2	Grupos experimentais.....	24
4.3	Justificativa para composição dos grupos experimentais....	24
4.4	Sequência experimental.....	25
4.4.1	<i>Fase 1: Tatuagem.....</i>	<i>25</i>
4.4.2	<i>Fase 2: Sequência do estudo.....</i>	<i>27</i>
4.5	Técnicas Utilizadas.....	28
4.5.1	<i>Preparo do animal.....</i>	<i>28</i>
4.5.2	<i>Anestesia subaracnoidea.....</i>	<i>28</i>
4.6	Observação clínica.....	29
4.7	Sacrifício.....	30
4.8	Exame histológico.....	30
4.9	Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	33
4.10	Modelo do estudo.....	33
4.11	Método estatístico.....	34
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÃO.....	44
8	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Desde muito tempo atrás, o hábito de tatuar o corpo faz parte da cultura de povos ao redor do mundo. Na Itália, em 1991, foi encontrada a múmia mais antiga do mundo, que viveu 5.300 anos antes de Cristo (a.C.) e permaneceu congelada desde então. Esta apresentava tatuagens em toda a coluna vertebral, além de uma cruz e desenhos tribais nas pernas.¹

As tatuagens também foram encontradas em múmias no Egito, que viveram entre 4000 e 2000 a.C. Naquela época, as tatuagens se relacionavam a rituais médicos, mágicos, de guerra e também marcavam etapas da vida, como o nascimento, a puberdade, a fase reprodutiva e a morte.^{1,2}

Assim, desde os primórdios da civilização, tatuar o corpo tem conotações cerimoniais, religiosas, tribais e estéticas para indivíduos e sociedades. Contudo, a partir do início dos anos 1990 passou a ser utilizada por alguns grupos sociais e em determinadas faixas etárias como uma forma de arte no corpo.^{1,3}

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.⁴ Os aparelhos utilizados para tatuar penetram a pele em profundidade que varia entre 0,6 e 2,2 mm.⁵

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. 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. 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.⁶⁻⁹ O pigmento que permanece no tecido fibroso da derme é o responsável pela coloração da tatuagem.⁵

Os pigmentos utilizados na tatuagem podem conter componentes orgânicos e inorgânicos, metais e solventes.¹⁰ Dentre os diversos agentes inorgânicos foram identificados o dióxido de titânio, o óxido de ferro, o sulfato de cádmio, o óxido crômico, o carbono.^{1,10-13}

Há grande variação na composição química dos pigmentos das tatuagens que dá origem às diferentes cores. Como exemplo, os pigmentos podem conter o alumínio, o cádmio (que colore de amarelo), o carbono (coloração preta), o cromo (coloração verde), o cobalto (coloração azul), o cobre, o ferro, o magnésio, o mercúrio (coloração vermelha), o níquel, o nitrogênio, o oxigênio, a sílica, o titânio e o enxofre. Muitos pigmentos não foram destinados para serem administrados em seres humanos, outros sequer são regulamentados pelas agências federais para essa finalidade.¹⁴

Atualmente são utilizados pigmentos orgânicos, porém pouco se conhece sobre a composição exata dessas tintas.^{4,15}

O corante dos pigmentos pode causar reações agudas ou crônicas na pele. As reações agudas podem ser alérgicas, eritematosas, pruriginosas, edematosas e infecciosas.¹⁶⁻²² Normalmente a tatuagem que é antiga não apresenta processos inflamatórios e infecciosos, mas existe a possibilidade de ocorrer reação de hipersensibilidade crônica e hiperplásica.²³

Os pigmentos vermelhos estão associados às reações mais tardias.^{22,24-26} Foi descrito ceratocantoma no interior de área pigmentada de vermelho da tatuagem. Suspeitou-se de que o pigmento vermelho fosse o desencadeador da lesão.²⁶

Não são incomuns as reações pseudolinfomatosas, as eczematosas, as granulomatosas e as liquenoides.²⁷

Está descrito que complicações infecciosas em pacientes portadores de sífilis, do vírus da imunodeficiência humana, de hepatite e de infecções locais podem, espontaneamente, difundir-se para planos mais profundos.²⁸

Nos Estados Unidos, 25% da população com idades entre 24 e 50 anos possuem tatuagens sendo que destes, aproximadamente, 50% são mulheres.³ Este fato é preocupante porque muitas mulheres estão em idade fértil e podem, em algum momento, serem submetidas à anestesia do neuroeixo. Como a localização das tatuagens é bastante variada, não é raro que estejam situadas na região lombar e sacral.²⁹

Pouco se conhece sobre as possíveis implicações da introdução de uma agulha para realização de anestesia regional sobre uma pele tatuada. Entretanto, já foi demonstrado na literatura que fragmentos de tecidos ficam retidos no interior da agulha, independentemente da existência do estilete,³⁰⁻³² e que a injeção de líquidos através destas agulhas resultaria na introdução destes fragmentos em locais mais profundos.⁴

Uma possível consequência de se introduzir uma agulha sem estilete da derme em direção ao sistema nervoso central é o desenvolvimento de tumor epidermoide iatrogênico, como relatado desde meados do século passado após múltiplas injeções de antibióticos no neuroeixo de crianças.³³ Subsequentemente, foram descritos casos similares em adultos.³⁴⁻³⁷

As agulhas sem estiletos são as mais propensas a reterem fragmentos em seu interior, contudo a presença de restos de tecidos também já foram encontrados em agulhas com mandril. Campbel et al.¹⁵ examinaram microscopicamente as pontas de agulhas de Quincke e Whitacre, calibre 25 G, para avaliar a presença de fragmentos de tecido, após múltiplas tentativas de punção. Eles observaram a presença de coágulos de sangue e fragmentos de gordura, mas não a de tecidos epidérmicos, em 80% das agulhas de Quincke e em 40% de Whitacre.

Puolakka et al.³⁸ 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 nas agulhas de Quincke (56%).

Ozyurt et al.³⁹ 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 mesmo, principalmente quando utilizadas as agulhas de maior calibre.

Ferraz et al.³² em estudo utilizando animais submetidos à punção sacral sobre a tatuagem, após injetarem 1 mL de solução salina a 0,9% através da agulha de Quincke de calibre 22G sobre lâmina histológica, observaram que em todos os esfregaços havia pigmentos de tinta vermelha provenientes de material contido na agulha.

Teoricamente, ao se realizar a anestesia do neuroeixo, a introdução da agulha em local onde existe tatuagem pode, após a injeção de soluções, conduzir fragmentos de tecidos para os espaços subaracnoideo ou peridural.⁴

São relatados casos de pacientes que desenvolveram atrofia crônica de músculos adjacentes à tatuagem, o que resultou em disfunção neuromuscular com neuropatias de plexo braquial.⁴⁰ O mecanismo desencadeador das lesões não foi bem estabelecido, mas aventou-se a hipótese de que reações imunes secundárias ao processo inflamatório^{41,42} ou efeitos tóxicos desencadeados pelo pigmento^{43,44} poderiam ser os responsáveis.

Alguns autores questionam se o pigmento contido na tatuagem pode desencadear aracnoidite química.⁴ Sabe-se que a aracnoidite adesiva pode ser desencadeada por diversos agentes administrados no espaço subaracnoideo ou peridural.⁴⁵

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.⁴⁵ Foi possível desencadear aracnoidite adesiva em modelo experimental em cães após injeção subaracnoidea de betametasona, de metilprednisolona e do antidepressivo amitriptilina.⁴⁶⁻⁴⁸

Muito pouco é descrito sobre a possibilidade de complicações neurológicas que ocorreram após anestesia do neuroeixo cuja punção foi realizada em pele tatuada. Não existem evidências que suportem a presença de efeitos tóxicos diretos da tinta proveniente de uma tatuagem já cicatrizada sobre o sistema nervoso central.²⁹

Existe relato de caso de nódulo linfático axilar contendo tinta, mimetizando melanoma metastático, em paciente cuja tatuagem foi realizada há 30 anos.⁴⁹ Também foi publicado outro relato de paciente submetida à analgesia de parto, na qual a agulha peridural foi introduzida em espaço peridural através de tatuagem. Algumas horas após, a parturiente queixou-se de estar dolorido e queimando o 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 destes foi sugerido que a presença de fragmentos de tecido, contendo pigmentos de tatuagem, poderia ter causado irritação nos tecidos lombares profundos.⁵⁰

Em pesquisa realizada em hospitais públicos e privados de Portugal, envolvendo 162 anestesiológicos que responderam a um questionário sobre qual a conduta que teriam ao se defrontarem com parturiente com tatuagem no local em que seria realizada a punção lombar para a anestesia do neuroeixo, mostrou que 92 médicos (56,8%) já haviam realizado punção raquidiana em pacientes tatuados e, destes, 84,4% em mais de uma ocasião. Os anestesiológicos disseram ainda que puncionaram a pele livre da tatuagem e tinham baseado a sua conduta em estudos publicados na literatura. Contudo, não existe consenso na literatura sobre qual a conduta correta nestes casos.⁵¹

Outro estudo similar, realizado em maternidades francesas da região do Languedoc-Roussillon, mostrou que 57% dos anestesiológicos que responderam ao questionário realizavam a punção sobre a pele tatuada.⁵²

Apesar de não existir, 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,⁵³⁻⁵⁵ o princípio da precaução orienta que se evite a punção em cima de uma pele tatuada.^{13,56-60}

Estudo experimental em coelhos mostrou que, seis meses após a punção subaracnoidea sobre pele tatuada, 33% dos animais estudados apresentavam focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e/ou aracnoide.³² 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.⁶¹

Fica então, para maiores esclarecimentos, a dúvida se o infiltrado inflamatório encontrado reflete a resolução de uma lesão ou o início de um processo que resultaria em aracnoidite adesiva.

2 HIPÓTESE

A punção subaracnoidea realizada sobre a pele tatuada de coelhos determina alterações inflamatórias precoces nas meninges.

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar, por meio de análise histológica, se a punção subaracnoidea realizada sobre a pele tatuada de coelhos determina alterações inflamatórias precoces (após 1 mês) nas meninges.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados

Foram utilizados 28 coelhos adultos jovens, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3.300 g e 5.400 g e comprimento de medula espinal (espaço medido entre a base do crânio e o espaço lombossacral) entre 38 e 41 cm, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Na seleção dos animais não foram incluídos aqueles que não apresentaram aspecto sadio e que tiveram necessidade de mais de uma punção subaracnoidea.

Os animais foram randomizados em dois grupos experimentais.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em dois grupos experimentais, com 14 animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia venosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea com injeção de solução salina a 0,9%. Os grupos se diferenciaram apenas pela presença ou não de tatuagem na pele através da qual foi realizada a punção subaracnoidea, ou seja:

- Grupo 1 (G1) – Coelho com tatuagem, punção subaracnoidea guiada por ultrassonografia e injeção de solução salina a 0,9%.
- Grupo 2 (G2) – Coelho sem tatuagem, punção subaracnoidea guiada por ultrassonografia e injeção de solução salina a 0,9%.

4.3 Justificativa para composição dos grupos experimentais

O grupo 1, que recebeu a solução salina a 0,9% através de punção subaracnoidea sobre a pele tatuada, teve por finalidade estudar os efeitos que os possíveis fragmentos de tecido contendo tinta da tatuagem determinariam se injetados no espaço subaracnoideo.

Por sua vez, o grupo 2 recebeu a solução salina a 0,9% através de punção subaracnoidea sobre a pele sem tatuagem, para que se pudesse avaliar os efeitos que o volume de solução administrada determinaria sobre o tecido nervoso.

4.4 Sequência experimental

O experimento foi realizado em duas fases.

4.4.1 Fase 1: Tatuagem

Em animais com 6 meses de idade, quando eles já são considerados adultos jovens, um tatuador artístico profissional realizou a tatuagem oval, com pigmento vermelho, ao redor dos espaços intervertebral S1-S2, com dois centímetros de diâmetro nos animais do G1. Para possibilitar o procedimento os animais foram submetidos à sequência experimental descrita abaixo:

- Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso à água.
- Pesagem.
- Anestesia com xilazina e cetamina
- Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa.
- Limpeza local com água e sabão.
- Tricotomia.
- Limpeza do local com solução salina fisiológica estéril.
- Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- Realização da tatuagem na região sacral nos animais do G1 (Figura 1).

- Manutenção em cativeiro por 30 dias para cicatrização da tatuagem (Figura 2).



Figura 1 - Pele de coelho imediatamente após ser tatuado.



Figura 2 - Pele de coelho 30 dias após a tatuagem.

4.4.2 Fase 2: Sequência do estudo

Em todos os animais foi realizada a sequência experimental que se segue:

- Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso à água.
- Pesagem.
- Anestesia com xilazina e cetamina.
- Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa.
- Medida do comprimento da medula espinal.
- Limpeza local com água e sabão.
- Tricotomia.
- Limpeza do local com solução salina a 0,9% estéril.
- Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- Colocação de campo estéril.
- Palpação e identificação dos espaços intervertebrais.
- Punção subaracnoidea sob orientação de ultrassonografia e identificação do espaço subaracnoideo.
- Injeção da solução salina a 0,9%.
- Retirada do animal da mesa.
- Observação clínica até recuperação da anestesia.
- Manutenção em cativeiro durante trinta dias sob observação clínica.
- Sacrifício do animal.
- Remoção da medula espinal em sua porção lombar e sacral.
- Fixação da peça anatômica.
- Análise da histologia.

4.5 Técnicas utilizadas

4.5.1 *Preparo do animal*

Antes da punção subaracnoidea, os coelhos foram preparados de acordo com o seguinte protocolo:

- Após período de jejum de 12 horas com livre acesso à água, os animais foram pesados, foi puncionada a veia marginal da orelha e anestesiados com injeção intravenosa de cloridrato de xilazina, na dose de 3 mg.kg^{-1} de peso corporal, e cloridrato de cetamina, na dose de 10 mg.kg^{-1} de peso corporal.
- Após a anestesia venosa, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica e, para obtenção do comprimento da medula espinal, foi medida a distância da base do crânio ao espaço lombossacral.
- Foi realizada a limpeza da pele e pelos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 10 cm ao redor do local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1-S2. Esta região foi lavada com solução salina a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.

4.5.2 *Anestesia subaracnoidea*

4.5.2.1 *Técnica de punção*

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, palpa-se as duas tuberosidades do osso íliaco 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.⁶²

O bloqueio subaracnoideo foi guiado com auxílio da ultrassonografia, utilizando o aparelho da marca SonoSite (USA), modelo M-turbo, que possui o recurso de Doppler tecidual de parede (TDI). Foi utilizado o transdutor micro-linear com frequência de, aproximadamente, 10 MHz.

A punção subaracnoidea foi realizada com agulha de Quincke de calibre 22G 21/2", por acesso mediano, com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°. A agulha foi introduzida lentamente, em direção cefálica até penetrar o ligamento amarelo, local em que se observa resistência diferente à progressão da agulha. Após a identificação do ligamento amarelo, a ultrassonografia guiou a agulha até o espaço subaracnoideo. Foi então retirado o mandril da agulha e verificado se houve o refluxo de líquido.

Após a identificação do espaço subaracnoideo, os animais de G1 e G2 receberam a solução salina a 0,9%. Todas e quaisquer dificuldades na realização da punção foram registradas.

4.5.2.2 *Volume injetado*

Foram administrados 5 µL por centímetro da medula espinal (0,2 mL),⁶² injetados em 1 segundo, em seringa de 1 mL descartável.

4.5.2.3 *Solução administrada*

A solução salina a 0,9% foi sintetizada pela indústria Hipolabor Farmacêutica, Brasil.

4.6 **Observação clínica**

Após a punção subaracnoidea e a injeção da solução, os animais foram retirados da mesa cirúrgica e, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto a motricidade e sensibilidade. A motricidade foi

avaliada pela observação clínica, baseando-se na classificação estabelecida por Drummond & Moore⁶³ 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.

Durante os 30 dias de cativeiro dos animais, foi avaliada a sensibilidade dolorosa por meio de preensão nas extremidades inferiores e superiores, bem como da pele da região dos dermatômos sacrais, lombares, torácicos e da orelha com auxílio de pinça dente de rato. Considerou-se positivo os seguintes sinais indicativos de dor: retração da pata, mudança de postura e gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos acima.

4.7 Sacrifício

O sacrifício foi realizado por decapitação, após anestesia prévia com cetamina e xilazina pela via intravenosa. A porção lombar e sacral da medula espinal e as raízes da cauda equina foram retiradas em tempo inferior a 3 minutos para minimizar os riscos de lesão tecidual desencadeada por isquemia e apoptose. O tecido medular e as raízes foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% para posterior exame histológico.

4.8 Exame histológico

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina tamponada. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges se iniciaram aproximadamente dez centímetros acima do local onde foi realizada a punção subaracnoidea, estendendo-se até o final da cauda equina em intervalos de meio centímetro. Os cortes do tecido medular foram

colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina.

O exame histológico das lâminas foi efetuado pela microscopia óptica. Os resultados obtidos pela análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges foram classificados como normais, quando não apresentavam alterações, ou lesados, determinando-se os achados observados, de acordo com os critérios abaixo.

- Tipo de lesão:
 - 1 - Aracnoidite
 - 2 - Aracnoidite + lesão nervosa
 - 3 - Lesão nervosa
- Localização da lesão:
 - 1 - Região posterior (P)
 - 2 - Região lateral (L)
 - 3 - Região anterior (A)
 - 4 - P + L
 - 5 - L + A
 - 6 - P + L + A
- Extensão da lesão:
 - 1 - < 10%
 - 2 - 10 a 50%
 - 3 - > 50%
- Profundidade da lesão:
 - 1 - Substância branca
 - 2 - Substância cinzenta
 - 3 - Substâncias branca e cinzenta
- Vaso sanguíneo:
 - 1 - Normal
 - 2 - Espessamento fibroso
 - 3 - Trombose

Na presença de aracnoidite adesiva:

- Aderência:
 - 0 - Ausente
 - 1 - Dura mater (D) + aracnóide (A)
 - 2 - A + pia-máter (P)
 - 3 - D + A + P
- Espessamento de meninge:
 - 0 - Ausente
 - 1 - Leve
 - 2 - Moderado
 - 3 - Intenso
- Infiltrado inflamatório:
 - 1 - $\frac{1}{2}$ +
 - 2 - +
 - 3 - ++
 - 4 - +++
 - 5 - ++++
- Fibrose:
 - 0 - Ausente
 - 1 - Leve
 - 2 - Moderada
 - 3 - Intensa
- Na presença de lesão de nervo:
 - 1 - Vacuolização
 - 2 - Infiltrado inflamatório
 - 3 - Macrófagos

A avaliação dos resultados histológicos foi encoberta, realizada por três pesquisadores (MEAM, EMG, ILFW) envolvidos no estudo.

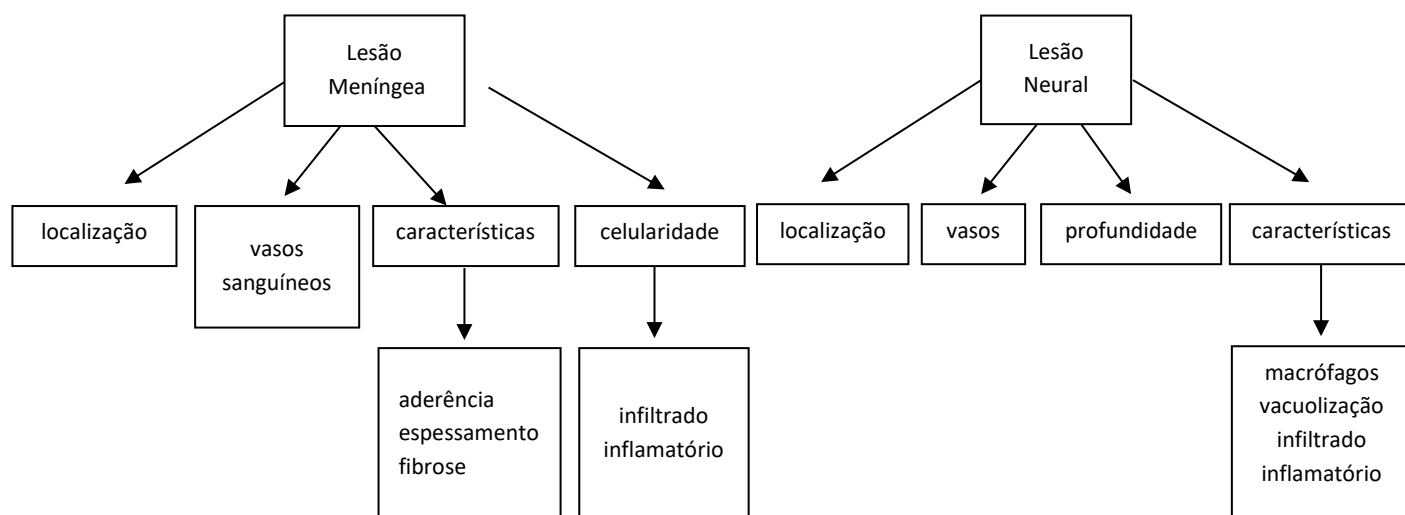


Figura 3 - Organograma da avaliação histológica.

4.9 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (Certificado nº 1122/2105 CEUA).

4.10 Modelo de estudo

Este estudo é controlado e randomizado. A análise histológica dos resultados foi encoberta.

Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador e por envelopes selados opacos.

4.11 Método estatístico

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso e ao comprimento de medula espinhal foi realizado o teste T de Student.

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.

5 RESULTADOS

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

Nenhum animal foi excluído da pesquisa por dificuldade na realização da punção ou na identificação do espaço subaracnoideo.

Todos os coelhos permaneceram sem alterações de motricidade e sensibilidade após a realização da injeção subaracnoidea de solução salina a 0,9%, assim como durante os 30 dias que permaneceram em cativeiro sob observação clínica.

Onze animais do G1 (78,5%) apresentaram focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter e/ou aracnoide (Quadro 1, Figuras 4, 5 e 6). Nos animais de G2 não foram encontradas alterações histológicas no tecido nervoso, nos vasos sanguíneos ou nas meninges (Figura 7).

Quadro 1 - Características histológicas dos animais pertencentes ao G1

Coelhos	Achados histológicos
C1	Tecido nervoso normal, meninges normais, vasos sanguíneos normais
C2	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (+) na pia-máter, região posterior (<10%)
C3	Tecido nervoso normal, meninges normais, vasos sanguíneos normais
C4	Tecido nervoso normal, meninges normais, vasos sanguíneos normais
C5	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (+) na pia-máter e aracnoide, regiões anterior, lateral e posterior (<10%)
C6	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter, regiões anterior, lateral e posterior (<10%)
C7	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na aracnoide, região posterior (<10%)
C8	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter e aracnoide, regiões anterior, lateral e posterior (<10%)
C9	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter, regiões anterior, lateral e posterior (<10%)
C10	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (+) na pia-máter, região posterior (<10%)
C11	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter, região posterior (<10%)
C12	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter, região posterior (<10%)
C13	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (++) na pia-máter, região posterior (<10%). Pia máter e aracnoide aderidas
C14	Focos de infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (1/2+) na pia-máter, região posterior (<10%)

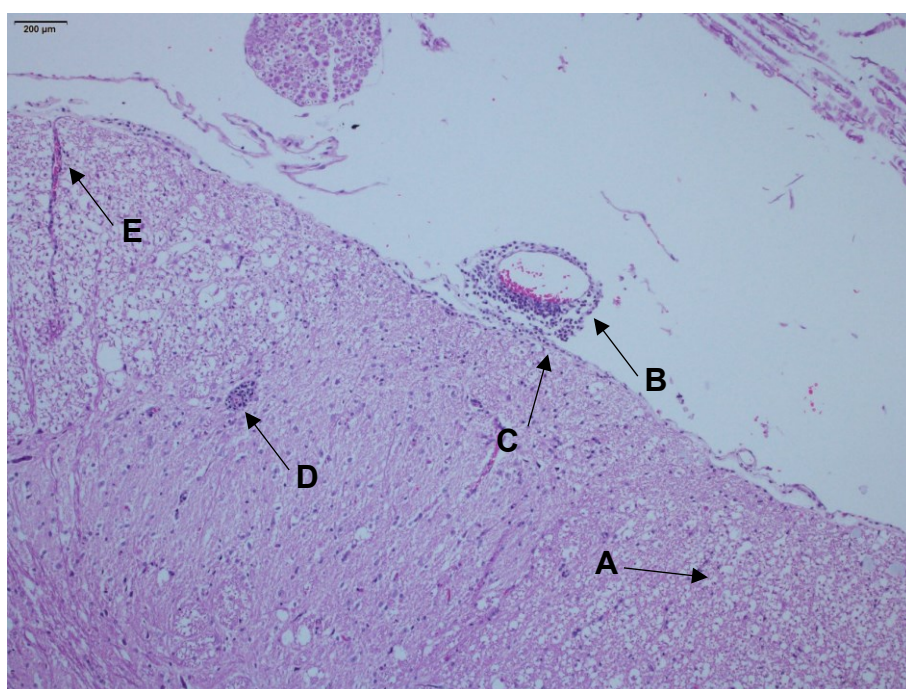


Figura 4 – Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter, região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D), espaço de Virchow-Robin (E), tecido nervoso normal (A) de animal do G1. HE 100x.

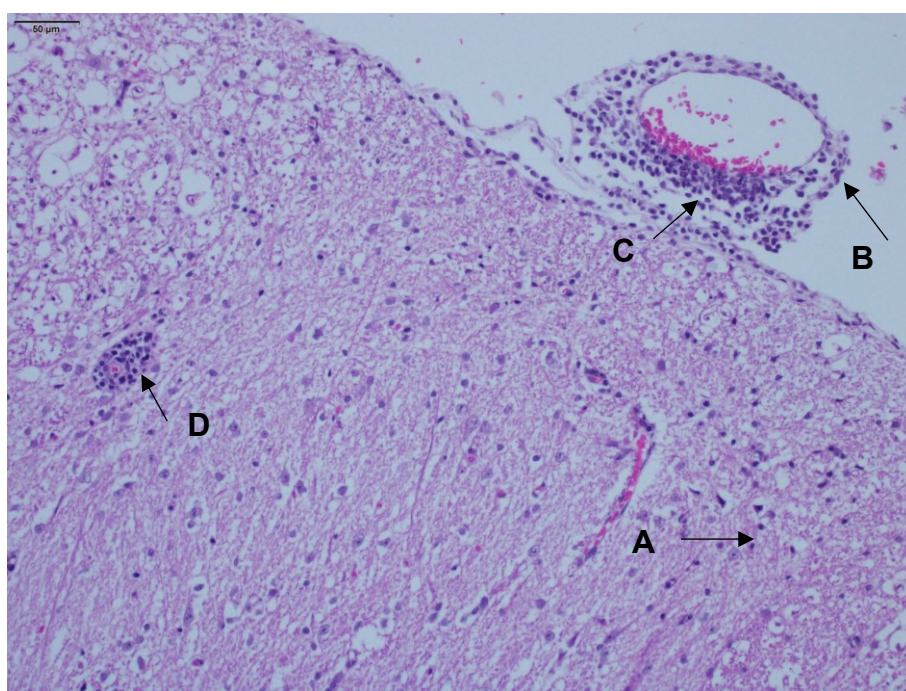


Figura 5 – Foco de infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter na região posterior da medula espinal (B e C), perivascular intraparenquimatoso (D), tecido nervoso normal (A) de animal do G1. HE 200x.

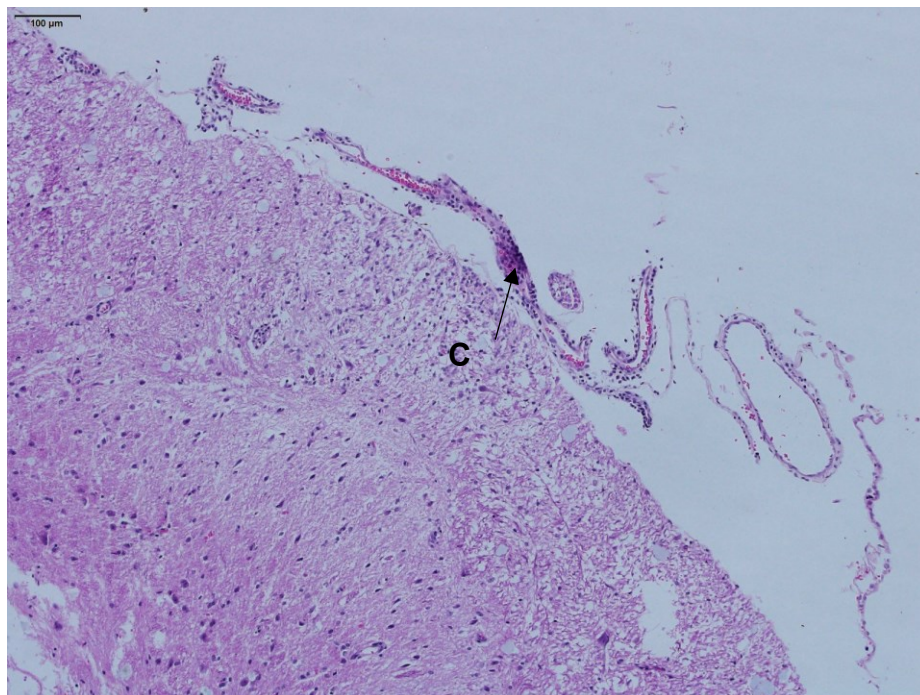


Figura 6 – Foco de infiltrado inflamatório linfocitário na pia-máter e aracnoide (C) de animal do G1 HE 100x.



Figura 7 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G2. HE 40x.

6 DISCUSSÃO

Em trabalho experimental prévio, foi observado que a punção raquidiana sobre a pele tatuada de coelhos determinava alterações histológicas meníngeas, quando a análise dos tecidos havia sido realizada seis meses após a punção raquidiana, e que fragmentos de material permaneciam no interior da agulha independentemente da existência do estilete.³² Tal constatação forneceu a primeira evidência objetiva de que a realização do bloqueio do neuroeixo sobre a pele tatuada pode não ser desprovida de efeitos adversos.

Como no estudo anterior, a análise histológica não mostrou alterações histológicas na parede das arteríolas, característica comum na aracnoidite adesiva crônica,³² tornou-se necessário esclarecer se o processo inflamatório observado era ainda incipiente ou se os achados histológicos foram resultantes da resolução de um processo inflamatório mais intenso que se desenvolveu anteriormente. Assim, foi constatado, no presente estudo, que a punção subaracnoidea através da pele tatuada desencadeia alterações inflamatórias meníngeas precocemente.

O local onde foi realizada a punção foi o espaço mais caudal possível que permite a passagem da agulha. Como espaço subaracnoideo do coelho é pequeno e ainda contém o tecido medular em seus segmentos caudais⁶⁴, é imperativo que o volume da solução administrada não seja o fator desencadeador de lesões nervosas. Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido podem levar ao aumento na pressão líquórica, comprometer o fluxo sanguíneo medular e causar isquemia medular com o surgimento de lesões neurológicas⁶⁵. Assim, o grupo controle (G2) teve por finalidade avaliar os possíveis efeitos que a injeção de uma solução no espaço subaracnoideo determinaria sobre os tecidos do neuroeixo e também excluir eventual de injeção intraneural inadvertida da solução. Está descrito na literatura que a injeção de solução salina, em volume de 0.05 mL, no interior dos fascículos de nervos periféricos de coelhos foi suficiente para degenerar os axônios^{66.67}.

Foram utilizadas agulhas de Quincke de maior calibre (22G2 1/2) para facilitar a punção sobre a rígida pele dos coelhos, além de possibilitarem a

introdução de maior quantidade de material estranho no espaço subaracnoideo para estudo dos seus efeitos. O pigmento escolhido foi o vermelho por estar associado às reações mais tardias.^{22,24-26}

Pudemos observar que, 30 dias após a punção, 78,5% dos animais do grupo G1 apresentaram alterações inflamatórias perivasculares nas meninges. Portanto, estas alterações podem indicar a fase inicial do processo inflamatório e este pode evoluir para aracnoidite adesiva.

A aracnoidite adesiva possui quadro clínico complexo, com variedade de sintomas e de diagnóstico clínico difícil porque os sinais e sintomas não são específicos.⁶⁸ 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, a aracnoide e as raízes nervosas, culminando com a aderência entre estas estruturas. Nesta fase, o edema das raízes começa a diminuir.⁶⁹

A aracnoidite adesiva crônica é a resolução do processo inflamatório crônico 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.⁶⁹ Estudos histológicos mostraram vasos sanguíneos com arterite e discute-se se esta é a causa ou o resultado da aracnoidite.⁵⁰ 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.⁷⁰

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, que é característica comum na aracnoidite adesiva crônica. Tal fato pode indicar que o processo inflamatório foi mais brando ou ainda esta em fase inicial. Pode ser que a quantidade de material introduzido no espaço subaracnoideo tenha sido pequena apesar de a agulha utilizada para realização da punção (Quincke, calibre 22G) ser maior do que a rotineiramente utilizada na prática clínica.

De particular interesse nota-se que, embora tenha sido empregada a mesma metodologia do estudo anterior, no qual 33% dos animais apresentaram inflamação linfoplasmocitária nas meninges seis meses após a punção da pele tatuada,³² quando o estudo foi realizado após 30 dias da punção sobre a tatuagem, o número de animais com inflamação linfocitária nos vasos das meninges foi bem superior (78,5%).

Assim sendo, pode se inferir que houve o contato de um agente agressor insolúvel com as meninges e este desencadeou uma resposta imunológica, e que provavelmente não houve tempo para que os plasmócitos, responsáveis pelas respostas humorais contra o agente lesivo,⁶¹ participassem do processo inflamatório.

A ausência de manifestações clínicas em ambas as pesquisas podem ser resultantes do tempo curto de seguimento dos animais em cativeiro após a punção lombar e pela característica focal das lesões das meninges, as quais não comprometeram o tecido nervoso.

Cita-se como limitação do estudo o fato de não terem sido encontrados pigmentos de tinta no sistema nervoso central dos animais do G1. Porém, o que fala a favor de que alguma substância diferente atingiu o sistema nervoso central é que nenhum animal de G2 apresentou alterações histológicas nas meninges. Outro fator limitante é inerente ao método experimental, uma vez que não se pode transferir os resultados diretamente para seres humanos. Há necessidade de que novas pesquisas sejam realizadas para melhor elucidar esta questão.

7 CONCLUSÃO

Neste modelo experimental, verificou-se que são precoces as alterações histológicas meníngeas desencadeadas pela introdução do pigmento da tatuagem, após punção subaracnoidea em coelhos.

8 REFERÊNCIAS

1. Memphis Archaeological and Geological Society (MAGS). 5.300 - year old ice man. MAGS Rockhound. 2003; 49:1.
2. Rodrigues A. A História da Tatuagem. Disponível em: <<https://www.portaltattoo.com/tatuagem/historia.aspx>> Acesso em: 10 de Setembro de 2017.
3. Laumann AE, Derick AJ. Tattoos and body piercings in the United States: a national data set. J Am Acad Dermatol. 2006; 55(5):413-21.
4. Douglas MJ, Swenerton JE. Epidural anesthesia in three parturients with lumbar tattoos: a review of possible implications. Can J Anaesth. 2002; 49(10):1057-60.
5. Sleth JC. Epidural anaesthesia and lumbar tattoo. Histology of tattoo: the missing link? Ann Fr Anesth Reanim. 2007; 26(3):266-7.
6. Lea PJ, Pawlowski A. Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis. Int J Dermatol. 1987; 26(7):453-8.
7. Goldstein AP. VII. Histologic reactions in tattoos. J Dermatol Surg Oncol. 1979; 5(11):896-900.
8. Mann R, Klingmüller G. Electron-microscopic investigation of tattoos in rabbit skin. Arch Dermatol Res. 1981; 271(4):367-72.
9. 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(3):285-94.
10. Timko AL, Miller CH, Johnson FB, Ross E. In vitro quantitative chemical analysis of tattoo pigments. Arch Dermatol. 2001; 137(2):143-7.

11. Kuczkowski KM. Epidural anesthesia in three parturients with lumbar tattoos: a review of possible implications [letter]. *Can J Anesth*. 2004; 51(1):93.
12. Corazza M, Zampino MR, Montanari A, Pagnoni A, Virgili A. Lichenoid reaction from a permanent red tattoo: has nickel a possible aetiologic role? *Contact Dermatitis*. 2002; 46(2):114-5.
13. Mercier FJ, Bonnet MP. Tattooing and various piercing: anaesthetic considerations. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009; 22(3):436-41.
14. Jacob CI. Tattoo-associated dermatoses: a case report and review of the literature. *Dermatol Surg*. 2002; 28(10):962-5.
15. Campbell DC, Douglas MJ, Taylor G. Incidence of tissue coring with the 25-gauge Quincke and Whitacre spinal needles. *Reg Anesth*. 1996; 21(6):582-5.
16. Amann U, Luger TA, Metze D. Lichenoid pseudolymphomatous tattooing reaction.[German]. *Hautarzt*. 1997; 48(6):410-3.
17. Bendsoe N, Hansson C, Sterner O. Inflammatory reactions from organic pigments in red tattoos. *Acta Derm Venereol*. 1991; 71(1):70-3.
18. Chung WH, Chang YC, Yang LJ, Hung SI, Wong WR, Lin JY et al. Clinicopathologic features of skin reactions to temporary tattoos and analysis of possible causes. *Arch Dermatol*. 2002; 138(1):88-92.
19. Greve B, Chytry R, Raulin C. Contact dermatitis from red tattoo pigment (quinacridone) with secondary spread. *Contact Dermatitis*. 2003; 49(5):265-6.

20. 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(12):1515-7.
21. Long GE, Rickman LS. Infectious complications of tattoos. *Clin Infect Dis.* 1994; 18(4):610-9.
22. Sowden JM, Byrne JP, Smith AG, Hiley C, Suarez V, Wagner B et al. Red tattoo reactions: X-ray microanalysis and patch-test studies. *Br J Dermatol.* 1991; 124(6):576-80.
23. 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(3):197-201.
24. Mortimer NJ, Chave TA, Johnston GA. Red tattoo reactions. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28(5):508-10.
25. Sowden JM, Cartwright PH, Smith AG, Hiley C, Slater DN. Sarcoidosis presenting with a granulomatous reaction confined to red tattoos. *Clin Exp Dermatol.* 1992; 17(6):446-8.
26. Kluger N, Minier-Thoumin C, Plantier F. Keratoacanthoma occurring within the red dye of a tattoo. *J Cutan Pathol.* 2008; 35(5):504-7.
27. Kluger N, Durand L, Minier-Thoumin C, Plantier F, Cotten H, Berteloot E et al. Pseudoepitheliomatous epidermal hyperplasia in tattoos: report of three cases. *Am J Clin Dermatol.* 2008; 9(5):337-40.
28. Chowfin A, Potti A, Paul A, Carson P. Spinal epidural abscess after tattooing. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(1):225-6.
29. Mavropoulos A, Camann W. Use of a lumbar tattoo to aid spinal anesthesia for cesarean delivery. *Int J Obstet Anesth.* 2009; 18(1):98-9.

30. Charlebois PA. Coring: the unseen menace. *Can Anaesth Soc J.* 1966; 13(6):585-97.
31. Brandus V. The spinal needle as a carrier of foreign material. *Can Anaesth Soc J.* 1968; 15(2):197-201.
32. Ferraz IL, Barros GAM, Neto PGF, Solanki D, Marques MEA, Machado VMV et al. Does the spinal blockade through tattooed skin cause histological changes nervous tissue and meninges? An experimental model in rabbits. *Reg Anesth Pain Med*, 2015; 40(5):533-8.
33. Choremis C, Economos D, Gargoulas A, Papadatos C. Intraspinal epidermoid tumours (cholesteatomas) in patients treated for tuberculous meningitis. *Lancet.* 1956; 271(6940):437-9.
34. Tabaddor K, Lamorgese JR. Lumbar epidermoid cyst following single spinal puncture. Case report. *J Bone Joint Surg Am.* 1975; 57(8):1168-9.
35. Gardner DJ, O'Gorman AM, Blundell JE. Intraspinal epidermoid tumour: late complication of lumbar puncture. *CMAJ.* 1989; 141(3):223-5.
36. 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(4):142-6.
37. McDonald JV, Klump TE. Intraspinal epidermoid tumors caused by lumbar puncture. *Arch Neurol.* 1986; 43(9):936-9.
38. Puolakka R, Andersson LC, Rosenberg PH. Microscopic analysis of three different spinal needle tips after experimental subarachnoid puncture. *Reg Anesth Pain Med.* 2000; 25(2):163-9.
39. Ozyurt G, Moğol EB, Tolunay S, Kerimoğlu B. Tissue coring with spinal needles. *Reg Anesth Pain Med.* 2000; 25(6):665.

40. Steiner I, Farcas P, Wirguin I. Tatoo-related brachial plexopathies with adjacent muscle atrophy. *Ann Intern Med.* 2000; 133(2):158-9.
41. Masson P, Rigot A, Cécile W. Brachial plexus neuropathy following pyogenic cervical adenophlegmon. *Arch Pediatr.* 1994; 1(8):735-7.
42. Beghi E, Kurland LT, Mulder DW, Nicolosi A. Brachial plexus neuropathy in the population of Rochester, Minnesota, 1970-1981. *Ann Neurol.* 1985; 18(3):320-3.
43. Schwartz RA, Mathias CG, Miller CH, Rojas-Corona R, Lambert WC. Granulomatous reaction to purple tattoo pigment. *Contact Dermatitis.* 1987; 16(4):198-202.
44. Lane KL, Vallera R, Washington K, Gottfried MR. Endoscopic tattoo agents in the colon. Tissue responses and clinical implications. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20(10):1266-70.
45. Rice I, Wee MY, Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth.* 2004; 92:109-20.
46. Barros GA, Marques ME, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over the dogs' spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(5):361-5.
47. Lima RM, Navarro LHC, Carness JM, Barros GM, Marques MEA, Solanski D et al. Clinical and histological effects of intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician.* 2010; 13(5):493-501.
48. Fukushima FB, Barros GA, Marques ME, Vidal EI, Ganem EM. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg.* 2009; 109(3):965-71.

49. Jack CM, Adwani A, Krishnan H. Tattoo pigment in an axillary lymph node simulating metastatic malignant melanoma. *Int Semin Surg Oncol*. 2005; 2:28.
50. Kuczkowski KM. Labour analgesia in a parturient with lumbar tattoo: a routine management or not? *Can J Anaesth*. 2004; 51(1):93.
51. Gaspar A, Serrano N. Neuroaxial blocks and tattoos: a dilemma? *Arch Gynecol Obstet*. 2010; 282(3):255-60.
52. Sleth JC, Guillot B, Kluger N. Lumbar tattoos and neuraxial anaesthesia in obstetrics: practice survey in Languedoc-Roussillon, France. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2010; 29(5):397-401.
53. Sleth JC. Epidural anaesthesia and lumbar tattoo. Histology of tattoo: the missing link? *Ann Fr Anesth Reanim*. 2007; 26(3):266-7.
54. Kluger N, Sleth JC, Guillot B. Lumbar tattoos and lumbar puncture: the emperor's new clothes? *Can J Anaesth*. 2007;54(10):855.
55. Kluger N, Fraitag S, Guillot B, Sleth JC. Why puncturing a lumbar tattoo during epidural analgesia cannot induce an epidermoid tumor. *Reg Anesth Pain Med*. 2010; 35(3):317.
56. Raynaud L, Mercier FJ, Auroy Y, Benhamou D; SOS ALR. Epidural anaesthesia and lumbar tattoo: what to do? *Ann Fr Anesth Reanim*. 2006; 25(1):71-3.
57. Kuczkowski KM. Labor analgesia for the parturient with lumbar tattoos: what does an obstetrician need to know? *Arch Gynecol Obstet*. 2006; 274(5):310-2.
58. Taleço T, Arese M, Ferreira E, Osório I, Monteiro F. Bloqueios do neuroeixo em parturientes com tatuagem na região lombar. Qual o estado da arte? *Rev Anest Reg Ter*. 2005; 40:18-24.

59. López Navarro AM, Matoses S, Gallego J, Peiró C, Galán S, Bustos M. Tattoos along the lumbar median line and epidural anesthesia. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2003; 50(9):491-3.
60. Kuczkowski KM. Lumbar tattoos and lumbar epidural analgesia: still a matter of concern? *Arch Gynecol Obstet.* 2008; 278(2):199-200.
61. Huston PD. The biology the immune system. *JAMA,* 1997; 278(22):1804-14.
62. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi M. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology,* 1985; 63(4):364-70.
63. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology,* 1989; 70(1):64-70.
64. Santos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Bioscience Journal (UFU).* 1999; 15:45-62.
65. 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(9):802-8.
66. Selander D, Brattsand R, Lundorf G, Nordborg C, Olsson Y. Local anaesthesia, importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application on bupivacaine (marcaine^R). *Acta Anaesth Scand,* 1979; 23(2):127-36.
67. 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 Anaesthesiol,* 1992; 69(5):433-8.

68. Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? I. Spine (Phila Pa 1976). 1983; 8(5):538-40.
69. Weston-Hurst E. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. J Path Bact. 1955; 70:167-8.
70. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Módolo NSP, Braz JRC. Effects of hyperbaric 0,5% bupivacaine contaminated with antiseptic solutions on spinal Cord and meninges. Experimental study in dogs. Reg Anesth. 1993; 18 (S):42.