

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde lisamina y la técnica quirúrgica convencional

REALIZADO POR:

Pedro F. Salazar

Wuily Carpio Rosso

Vanessa Carpio Rosso

TUTORES:

Pedro F. Salazar

Shirley Rosenstiehl

Identificación del proyecto

Institución académica: Universidad del Rosario

Dependencia: Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Título de la investigación: Proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde lisamina y la técnica quirúrgica convencional

Instituciones participantes: Fundación Oftalmológica Nacional

Tipo de investigación: Estudio observacional de corte transversal

Investigador principal: Pedro F. Salazar

Investigadores asociados: Wuily A. Carpio Rosso, Vanessa P. Carpio Rosso

Asesor clínico o temático: Pedro F. Salazar

Asesor metodológico: Shirley Rosenstiehl

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Tabla de contenido

1. Introducción	7
1.1 Planteamiento del problema.....	7
1.2 Justificación	8
2. Marco teórico.....	8
3. Pregunta de investigación.....	12
4. Objetivos	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivo específico.....	13
5. Metodología	13
5.1 Tipo y diseño de estudio	13
5.2 Población	13
5.3 Marco muestral	14
5.4 Criterios de selección	15
5.4.1 Criterios de inclusion.....	15
5.4.2 Criterios de exclusión	15
5.5 Variables	15
5.6 Hipótesis	17
5.6.1 Hipótesis nula	17
5.6.2 Hipótesis alterna.....	17
5.7 Plan de análisis.....	17
5.8 Proceso de recolección de la información.....	18
6. Aspectos éticos.....	18
7. Administración del proyecto.....	19
7.1 Cronograma	19
7.2 Presupuesto	20
8. Resultados	20
9. Discusión.....	22
10. Referencias	26

RESUMEN

Propósito:

Comparar la proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival (NIC) con la técnica guiada por tinción con verde lisamina y la técnica quirúrgica convencional en pacientes de la Fundación Oftalmológica Nacional.

Metodología:

Estudio observacional de corte transversal, se incluyeron 98 pacientes que fueron operados por neoplasia intraepitelial conjuntival entre enero del 2017 y junio del 2019.

Resultados:

La media de edad fue 58 años (rango 26-82 años). La distribución del género fue 46.9% hombres y 53.1% mujeres. La lateralidad del ojo más afectado fue el izquierdo en 54.1%.

En el 54.1% de los pacientes la neoplasia abarcó 3 meridianos de extensión con referencia al limbo corneal; el 94.9% presentó compromiso corneal de NIC. La tinción con fluoresceína fue positiva en la mayoría de pacientes en 92.9%.

En todos los pacientes se usó crioterapia, mientras que en el 50% del total se usó la tinción intraoperatorio de verde lisamina. El diagnóstico histopatológico de NIC fue leve 3.1%, moderado 9.2% y severo en 87.8%, se usó la técnica de plastia libre para cubrir el defecto conjuntival en el 98%.

El análisis histopatológico de la neoplasia resecada en el grupo de verde lisamina presentó bordes libres en 98% y en el grupo control 83.7%, esta asociación fue estadísticamente significativa ($p=0,031$).

Conclusión:

La tinción de verde lisamina es útil como guía en la resección quirúrgica de neoplasias intraepiteliales conjuntivales, permitiendo obtener una menor proporción de bordes comprometidos en el resultado histopatológico.

Palabras claves: Neoplasia intraepitelial conjuntival; verde lisamina; histopatología; bordes comprometidos

ABSTRACT

Purpose:

To compare the proportion of compromised edges of the histopathological outcome of patients operated for conjunctival intraepithelial neoplasia (CIN) with the lissamine green stained technique and the conventional surgical technique in patients of the Fundacion Oftalmologica Nacional.

Methodology:

A cross-sectional study was conducted, including 98 patients who were operated for intraepithelial conjunctival neoplasia between January 2017 and June 2019.

Results:

The average age was 58 years (range 26-82 years). The gender distribution was 46.9% men and 53.1% women. The laterality of the most affected eye was the left one in 54.1%.

In 54.1% of the patients, the neoplasm covered 3 meridians of extension with reference to the corneal limbus; 94.9% presented CIN corneal commitment. Fluorescein staining was positive in the majority of patients in 92.9%.

Cryotherapy was used in all patients, while in 50% of the total intraoperative staining of lissamine green was used. The histopathological diagnosis of CIN was mild 3.1%, moderate 9.2% and severe in 87.8%, the free plasty technique was used to cover the conjunctival defect in 98%.

Histopathological analysis of resected neoplasia in the lissamine green group showed free borders in 98% and in the control group 83.7%, this association was statistically significant ($p=0.031$).

Conclusion:

Lissamine green staining is useful as a guide in the surgical resection of conjunctival intraepithelial neoplasms, allowing a smaller proportion of compromised edges to be obtained in the histopathological result.

Keywords: Intraepithelial conjunctival neoplasia; lissamine green; histopathology; compromised borders

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema:

Los tumores conjuntivales incluyen un amplio espectro de neoplasias, desde lesiones benignas como dermoides conjuntivales, premalignas como neoplasias intraepiteliales y malignas como los melanomas (1,2). La frecuencia y los tipos de lesiones dependerán de los factores demográficos como la edad, género y raza, así como de otros factores entre los que se encuentran la exposición a radiación ultravioleta y el estado del sistema inmune (1).

Aunque han surgido nuevos tratamientos, la excisión quirúrgica sigue estando vigente y consiste en la resección de tejido anormal a criterio clínico del cirujano y aplicación de crioterapia en los bordes de resección, con el posterior análisis histopatológico del tejido resecado (3,4). Este procedimiento ha mejorado en el transcurso de los años con la técnica de “no tocar” de Shields y la ampliación de los márgenes de resección (4). Sin embargo, existe un porcentaje de casos en los cuales los márgenes de resección quedan comprometidos (25.4% según Tabin y col. (5)), incrementando el riesgo de recurrencia de la enfermedad (4,6) y requiriendo tratamientos adicionales para evitar complicaciones como la extensión orbitaria de la neoplasia, descrito por Murthy y cols en el 2017 (7). Entre los tratamientos adicionales están descritos el uso de medicamentos tópicos (4) y nuevos procedimientos quirúrgicos, estos últimos incrementan la carga económica para el paciente y/o seguro de salud, e incrementa también el número de visitas al hospital, descritas como 4 en el año para los pacientes operados y con 2 visitas adicionales para los pacientes con tratamiento médico según Moon y col (3,5,8).

El uso de tinciones oculares en oftalmología, permite evaluar la superficie ocular in-vivo y teñir células degeneradas (9–11). El verde Lisamina es un colorante acido-orgánico producido sintéticamente, que puede usarse para la tinción vital de la conjuntiva y córnea (12). Se ha descrito como una tinción segura, con pocos efectos adversos y sin toxicidad para la superficie ocular (12,13). La descripción del uso de tinciones en cirugía conjuntival es escasa, Kaji y cols. describieron un caso en Japón, en el cual se empleó azul de toluidina para la resección de un carcinoma escamocelular difuso con buenos resultados (14).

El propósito de este estudio es comparar los resultados del análisis histopatológico, de los tejidos obtenidos de pacientes operados de neoplasias conjuntivales, con y sin el uso de verde

lisamina. Esperamos encontrar un menor porcentaje de compromiso de los bordes de resección con el uso de esta tinción.

1.2 Justificación:

La neoplasia conjuntival es la patología más frecuente en la clínica de oncología ocular de la Fundación Oftalmológica Nacional. Por ser lesiones premalignas, existe el riesgo que comprometan tejidos más profundos y se disemine hacia las cadenas ganglionares por fuera del globo ocular, es por ello que su resección completa es muy importante (15).

Durante la práctica clínica y en la literatura, existe un porcentaje considerable de pacientes que requieren tratamientos adicionales, debido a la presencia de bordes de resección comprometidos (5). Estos tratamientos adicionales tendrán un impacto negativo en la economía del paciente y en el sistema de salud (3).

Las tinciones vitales son instrumentos de ayuda diagnóstica, económicos, seguros y de fácil acceso; tiñen células alteradas in-vivo y pueden ser usados como coadyuvantes en cirugía de neoplasia intraepitelial conjuntival (10,12).

En este estudio proponemos el uso de verde lisamina, como tinción diagnóstica y coadyuvante en el procedimiento quirúrgico, con el fin de delimitar mejor los bordes de la lesión y conseguir resección completa del tumor. El uso de esta tinción vital no extenderá el tiempo de cirugía del paciente y tampoco incrementará el costo. No existen estudios previos que reporten el uso de verde lisamina en cirugía de neoplasia de la superficie ocular, siendo este trabajo una idea novedosa que permitirá mejorar la efectividad del tratamiento quirúrgico.

2. MARCO TEÓRICO:

Los tumores conjuntivales reúnen un amplio espectro de neoplasias, dentro de las cuales encontramos lesiones benignas y otras con características premalignas o malignas. La diferenciación de estos tumores se hace de acuerdo a los antecedentes médicos y las características clínicas de la lesión evaluada en la lámpara de hendidura; por otro lado, la frecuencia y tipo de tumoración varía de acuerdo a los aspectos demográficos, estado del sistema inmune y exposición crónica a determinados factores ambientales (1,2). Según

Shields y cols, en uno de los estudios más grandes que describe la frecuencia de los diferentes tumores en una población de 5002 pacientes, encontró que el 52% presentaban tumores benignos, el 18% premalignos y 30% malignos (16).

Anatomía de la conjuntiva:

La conjuntiva es una membrana mucosa que cubre la parte anterior del globo ocular, se extiende desde el borde del párpado y su cara posterior (conjuntiva tarsal), pasando por el fórnix y luego sobre el globo ocular (conjuntiva bulbar). Está compuesta por un epitelio y estroma, este último se distribuye en mayor cantidad a nivel del fórnix y es más delgada cerca al limbo esclerocorneal. El epitelio es de tipo columnar y estratificado escamoso (2).

Lesiones malignas de la superficie epitelial:

Las neoplasias de células escamosas se pueden presentar de dos maneras, aquellas localizadas en el epitelio corneal que no sobrepasan la membrana basal, conocidas como neoplasias intraepiteliales conjuntivales (NIC) y carcinomas escamosos, aquellos que han sobrepasado la membrana basal con riesgo a posterior compromiso sistémico a través de metástasis por los nódulos linfoides regionales (2,6). Estas neoplasias escamosas de la superficie ocular comprenden la tercera causa más común de tumores oculares, después del melanoma y linfoma. Muchos de ellos pueden pasar desapercibidos, debido a su lento crecimiento y a la ausencia de síntomas (17).

La prevalencia de estos tumores varía entre 0.2 a 12 casos por millón de habitantes al año. Existen condiciones que aumentan la frecuencia de estos tumores como la edad alrededor de los 56 años, población que vive cerca al ecuador, mayor exposición a la radiación ultravioleta (UV), exposición al Virus del Papiloma Humano, exposición a derivados del petróleo, humo de cigarrillo, químicos como el arsénico, heridas en la superficie ocular, deficiencia de la vitamina A, descendencia europea, raza caucásica e infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (17).

Siendo la radiación UV-B uno de los principales factores de riesgo, se ha descrito que produce daño en el DNA y formación de dímeros de pirimidina, los cuales producen daño en la reparación celular e inicio de la oncogénesis (17).

Neoplasia intraepitelial conjuntival:

Es uno de los tumores más frecuentes de la superficie ocular, con una incidencia de 2 – 3 casos por cada 100 000 habitantes (1,6,18). Se describen como lesiones gelatinosas, sésiles o papilomatosas que pueden extenderse de manera difusa sobre la superficie conjuntival, en zonas de exposición como lo es la hendidura interpalpebral, siendo menos frecuentes en el fórnix o conjuntiva palpebral (2,16).

Se emplea también el término de displasia o carcinoma in situ, en donde la displasia no refleja un compromiso absoluto del epitelio corneal y se puede graduar en leve, moderada y severa, mientras que en el carcinoma in situ representa el compromiso total del espesor del epitelio (2).

Debido a que estas lesiones no tienen límites definidos, es posible que la resección sea incompleta con el riesgo de recidivas. A pesar de esto el curso de la mayoría de estas lesiones es benigno, no presenta tanto riesgo de metástasis y la complicación más frecuente es la recidiva con extensión superficial de la enfermedad (18).

Diagnóstico:

Debido a que la conjuntiva es una membrana mucosa expuesta y fácil de examinar, el diagnóstico de estas tumoraciones se realiza en un estadio temprano (2). El término NIC abarca distintos grados de displasia y carcinoma in situ, consideradas lesiones premalignas ya que no han sobrepasado la membrana basal epitelial (18), pero existe el riesgo de malignización a carcinoma escamo-celular con el pasar de los años (16).

El diagnóstico se hace inicialmente por la apariencia clínica durante el examen bajo lámpara de hendidura (19), se ha descrito el empleo de tinciones vitales durante la consulta oftalmológica como un coadyuvante diagnóstico en la sospecha de lesiones premalignas o malignas (20,21).

Tinciones vitales:

Las tinciones más usadas en la consulta oftalmológica son la fluoresceína, verde lisamina y rosa bengala. La fluoresceína se considera la tinción más importante y útil para lesiones corneanas mientras que el verde lisamina y rosa bengala como las más útiles para evaluar conjuntiva (10)(21).

El verde lisamina se introdujo en el año 1973 por Norn (10), es un colorante ácido-orgánico producido sintéticamente, que puede usarse para la tinción vital de la conjuntiva y córnea, siendo bien toleradas por el paciente (12), esta tinción no tiñe las células sanas, no es tóxica

y es ideal para la detección de células degeneradas o células muertas, a diferencia de la rosa de bengala, que puede teñir células sanas o en proliferación epitelial, viabilidad afectada y que además produce mayor prurito que el verde de lisamina (10). Esta tinción contiene 2 grupos aminofenoles, no se ha reportado que sea teratogénica o carcinogénica cuando se utiliza en concentraciones típicas de las preparaciones oftálmicas (12).

Diagnósticos diferenciales:

Los diagnósticos diferenciales son otras tumoraciones conjuntivales, como pterigiión y nevus amelanocíticos; siendo el análisis histopatológico, el método más preciso para diferenciarlos (19,21). El estándar de referencia diagnóstico es el examen histopatológico por biopsia excisional (19,21).

Tratamiento:

Existen diferentes opciones de tratamiento para estas lesiones. La quimioterapia tópica usando 5-fluorouracilo o Mitomicina C, inmunoterapia tópica, uso tópico o subconjuntival de interferón alfa 2-b, han adquirido gran popularidad en los últimos años. También está descrito el uso de medicación tópica antiviral o terapia fotodinámica.

Otra alternativa terapéutica es la escisión completa del tumor usando la técnica de “no tocar” descrita por los doctores Shields, para evitar el riesgo potencial de diseminación. Esta técnica comprende la resección del tejido engrosado y con características anormales con márgenes amplios de resección de hasta 4 mm de conjuntiva libre de tumor a criterio clínico del cirujano, la cual se complementa con el uso de crioterapia en los bordes de resección como tratamiento adyuvante (1,4).

La presencia de márgenes de resección comprometidos en el análisis de histopatología es frecuente (6), tal como lo describe Tabin y colaboradores (1996) donde encontraron una prevalencia de este compromiso en el 25.4% de los pacientes considerándose el factor más importante de recurrencia de la neoplasia (5).

Las neoplasias conjuntivales pueden manifestarse como estructuras semi transparentes difíciles de diferenciar de la conjuntiva sana (11) y algunas series reportan elevadas tasas de recurrencia tras la excisión quirúrgica de la tumoración, alcanzado un 33% a los 10 años según describe Besley y col (22) o 10% al año y 21% a los 5 años de la cirugía, según Galor y col (4). Estos pacientes requerirán tratamientos adicionales para controlar la enfermedad (6,7).

El tratamiento médico se puede usar como terapia inicial quimiorreductor, o de manera adyuvante en caso de que haya bordes de resección comprometidos, con la finalidad de eliminar cualquier remanente de neoplasia y evitar la recurrencia. Entre los efectos adversos que encontramos con estos medicamentos tenemos: Blefaritis, conjuntivitis, queratoplastia punteada superficial, epífora y molestias oculares; con menor frecuencia se ha reportado disfunción de células limbares, haze corneal, catarata (23) y en casos más severos, úlcera corneal y perforación.

Nanji y colaboradores compararon los costos entre el tratamiento médico y quirúrgico, en 98 pacientes con diagnóstico de neoplasia escamosa de la superficie ocular, encontrando un costo-efectividad similar con ambos tratamientos (8). En otro estudio, con la misma población, Moon y cols encontraron que los costos de ambos tratamientos eran similares, dependiendo del plan de salud del paciente, además los pacientes con tratamiento médico requerían 2 visitas adicionales al año comparado con el grupo quirúrgico (3).

La cirugía es un tratamiento que en la actualidad sigue dando buenos resultados (11), en nuestro medio sigue cumpliendo un rol fundamental en el manejo de esta patología, debido a que el tratamiento médico con sus costos y dificultad de disponibilidad no están al alcance de todos los pacientes y no son entregados con facilidad por los seguros médicos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la proporción de bordes comprometidos en el resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde lisamina comparado con la técnica quirúrgica convencional en pacientes de la Fundación Oftalmológica Nacional?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Comparar la proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde

lisamina y la técnica quirúrgica convencional en pacientes de la Fundación Oftalmológica Nacional.

4.2 Objetivos específicos:

1. Describir las características demográficas de los pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival en la Fundación Oftalmológica Nacional.
2. Describir las características clínicas de la lesión conjuntival de los pacientes sometidos a cirugía por sospecha de neoplasia intraepitelial conjuntival.
3. Describir los resultados histopatológicos de los pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival.
4. Determinar la proporción de bordes comprometidos de los especímenes obtenidos por las diferentes técnicas quirúrgicas.
5. Comparar la proporción de bordes libres del resultado de histopatología de ambos grupos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo y diseño de estudio:

Estudio observacional de corte transversal, analítico. Se revisará la información de las historias clínicas de pacientes de la Fundación Oftalmológica Nacional, que hayan sido sometidos a cirugía por diagnóstico clínico de NIC.

Se incluirán los pacientes operados por técnica quirúrgica convencional y en los que se haya utilizado verde lisamina como guía para resección del tejido conjuntival patológico, que cuenten con la información completa en la historia clínica y reporte de patología con mención de estado de bordes de la lesión.

La información de las historias clínicas se consignará en Excel v.15.33. Se incluirán variables cualitativas codificadas y cuantitativas, de los hallazgos clínicos prequirúrgicos y resultado del reporte de patología. Los datos personales serán codificados para que no pueda ser identificado el sujeto de estudio.

5.2 Población:

- *Población de referencia:* Pacientes de la Fundación Oftalmológica Nacional.

- *Población objetivo*: Pacientes operados de neoplasia intraepitelial conjuntival.
- *Población accesible*: Pacientes operados de neoplasia intraepitelial conjuntival entre enero del 2017 y junio del 2019 en la Fundación Oftalmológica Nacional.

5.3 Marco muestral:

La población de estudio será seleccionada de los registros de cirugía de la Fundación Oftalmológica Nacional, realizando un filtro en el sistema de acuerdo al tipo de procedimiento quirúrgico. Se incluirá de forma consecutiva la información de pacientes sometidos a cirugía por cada técnica, hasta completar el número de la muestra calculada.

Para la selección de los sujetos se aplicarán los criterios de inclusión y exclusión descritos mas adelante. Se incluirán solo pacientes operados por el Dr. Pedro Felipe Salazar, oftalmólogo oncólogo de la Fundación Oftalmológica Nacional.

El calculo del tamaño de la muestra se realizó en el programa estadístico Epidat 3.1; módulo de muestreo, para comparación de proporciones de grupos independientes.

Parámetros para calculo del tamaño de la muestra:

- Proporción esperada en población 1: 25,0% *
- Proporción esperada en población 2: 5,0% **
- Razón entre tamaños muestrales: 1,00
- Nivel de confianza: 95,0%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Población 1	Población 2	Total
80,0	49	49	98

* Población 1, corresponde a la proporción de bordes comprometidos esperados en sujetos operados con la técnica quirúrgica convencional, según el estudio de Geoffrey Tabin y cols (5).

** La proporción de la población 2 se estimó según la experiencia clínica del Dr. Pedro Felipe Salazar en un 5%.

La muestra total será de 98 ojos; 49 ojos operados con la técnica quirúrgica convencional y 49 ojos operados con técnica guiada con verde lisamina.

5.4 Criterios de selección:

5.4.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años, sometidos a cirugía por diagnóstico de neoplasia intraepitelial conjuntival, operados por el Dr. Pedro Felipe Salazar entre enero del 2017 y junio del 2019.
- Información completa en la historia clínica.
- Reporte de patología con mención del estado de bordes de la lesión.

5.4.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de ojo seco severo o hallazgos descritos en el reporte de historia clínica como: Queratitis punteada severa, OSDI puntaje >30, puntaje de tinción corneal con fluoresceína o rosa de bengala \geq a III en escala de Oxford y tiempo de ruptura lagrimal alterado (tiempo de ruptura <10 segundos, test de schirmer menor a 10 mm (en 5 minutos)) y osmolaridad > 310 mOsm.
- Pacientes con neoplasia intraepitelial conjuntival con extensión mayor a un cuadrante ocular.

5.5 Variables:

Tabla 1. Definición de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	ESCALA	UNIDAD DE MEDIDA	POSIBLES VALORES
Edad	Años transcurridos desde el nacimiento hasta la fecha actual	Cuantitativa	Continua	Años cumplidos	
Género	Identidad sexual	Cualitativa	Nominal		Masculino (1) Femenino (2)

Lateralidad	Lado del ojo evaluado	Cualitativa	Nominal dicotómica		Ojo derecho (1) Ojo izquierdo (2)
Extensión en zonas horarias	Zonas horarias que compromete la lesión tomando como referencia el limbo corneal	Cualitativo	Nominal politómica		1, 2, 3
Compromiso corneal	Si la neoplasia sobrepasa limbo corneal	Cualitativo	Nominal dicotómica		Sí (1) / No (2)
Fluoresceína	Tinción de la lesión conjuntival con este colorante	Cualitativa	Nominal dicotómica		Sí (1) / No (2)
Crioterapia	Si se uso crioterapia en procedimiento operatorio	Cualitativo	Nominal dicotómica		Sí (1) / No (2)
Verde lisamina	Tinción ocular usada en cirugía	Cualitativa	Nominal dicotómica		Sí (1) / No (2)
Plastia libre	Técnica empleada para cubrir el defecto conjuntival	Cualitativa	Nominal dicotómica		Plastia libre del ojo (1) / afrontamiento (2)
Patología	Resultado del examen histopatológico	Cualitativa	Ordinal politómica		NIC Leve (1), moderado (2) o severo (3)
Margen de resección en técnica	Bordes de biopsia analizado por histopatología	Cualitativa	Nominal dicotómica		Libre (1) o comprometido (2)

convencional					
Margen de resección en técnica con verde lisamina	Bordes de biopsia analizado por histopatología	Cualitativa	Nominal dicotómica		Libre (1) o comprometido (2)

5.6 Hipótesis:

5.6.1 Hipótesis nula: La proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde lisamina es igual al resultado de la técnica convencional.

5.6.2 Hipótesis alterna: La proporción de bordes comprometidos del resultado histopatológico de pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica guiada por tinción con verde lisamina es diferente al resultado de la técnica convencional

5.7 Plan de análisis estadístico

Se realizará un análisis univariado con descripción de frecuencias absolutas y porcentajes para las variables categóricas. Se explorará la normalidad de las variables cuantitativas mediante el test estadístico de Kolmogorov Smirnov. Las variables cuantitativas continuas con distribución normal serán descritas como media y desviación estándar; las variables cuantitativas con distribución no normal serán descritas como mediana y rango intercuartílico. La comparación de proporciones se realizará mediante el test estadístico χ^2 . El análisis estadístico será realizado con el programa estadístico SPSS v21.

Control del sesgo

Se incluirán pacientes operados por un solo cirujano para evitar modificaciones en la técnica quirúrgica que puedan influenciar en la resección de la neoplasia y su resultado histopatológico.

Los sesgos de selección se controlarán incluyendo todos los sujetos elegibles en el estudio, además la inferencia del presente estudio se hará únicamente hacia los pacientes operados por el Dr. Pedro F. Salazar, cualquier uso de estos datos será revisado bajo el criterio de la persona tratante.

El control de sesgo se realizará en la selección de los pacientes; se excluirán los pacientes con neoplasia intraepitelial conjuntival que comprometan mas de un cuadrante ocular, tomando como referencia el limbo corneal, debido a que en lesiones mas grades aumenta el grado de dificultad al retirar el tumor, pudiendo dejar bordes de resección comprometidos. Esto evitaría que los sujetos fuesen clasificados erróneamente.

Serán excluidos los pacientes con ojo seco severo (según criterios de exclusión) debido a que la alteración de la superficie ocular puede confundir el resultado de la tinción, por eso, se verificará este diagnóstico y descripción clínica en las historias de los pacientes.

5.8 Proceso de recolección de la información:

Se filtrarán los pacientes que hayan sido operados por el Dr. Pedro Salazar y que se les haya realizado el procedimiento de: “Resección de tumor maligno de la conjuntiva”, de la base de datos del registro diario de cirugía. Se realizará una nueva base de datos en Excel para recolectar los pacientes que cumplan los criterios de inclusión y exclusión.

La base de datos será manipulada por un solo integrante del equipo investigador, y cada vez que la base de datos sea manipulada se revisará de forma aleatoria 3 registros previos, para confirmar que los datos estén correctos.

Los datos serán guardados de manera confidencial, los datos personales serán codificados para que no pueda ser identificado el sujeto de estudio, solo el investigador tendra acceso a esta información. Los investigadores harán uso del usuario y contraseña brindado por la Fundación Oftalmológica Nacional para acceder a las historias clínicas y recolectar los datos.

6. ASPECTOS ÉTICOS

Los investigadores se adhieren, a los principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos, bajo la Declaración de Helsinki – 2013 Asamblea General. A las regulaciones locales del Ministerio de Salud de Colombia Resolución 8430 de 1993 en lo concerniente al Capítulo I “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”, la presente investigación es clasificada *“Sin riesgo: El cual se define como estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los*

que se consideran: Revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”.

Se limitará el acceso de los instrumentos de investigación únicamente a los investigadores según Artículo 8 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Será responsabilidad de los investigadores el guardar con absoluta reserva la información contenida en las historias clínicas y a cumplir con la normatividad vigente en cuanto al manejo de la misma reglamentados en los siguientes: Ley 100 de 1993, Ley 23 de 1981, Decreto 3380 de 1981, Resolución 008430 de 1993 y Decreto 1995 de 1999.

Una vez el Comité de Ética en Investigación - FUNDONAL de aprobación al protocolo, se solicitará al Comité de Historias Clínicas, permiso para la revisión de las historias que cumplan con los criterios de inclusión.

No existe ningún conflicto de interés por parte de los autores del estudio que deba declararse.

7. ADMINISTRACIÓN DEL PROYECTO

7.1 Cronograma:

Actividades propuestas	Tiempo en meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración del protocolo	X											
Recolección de datos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de datos										X	X	
Presentación del reporte final										X	X	X
Preparación de publicación											X	X
Revisión de la literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

7.2 Presupuesto:

Rubros	Fundonal
Asesoría, Publicación	\$ 2,800,000.00
Papelería	\$ 500,000.00
Comité de ética	\$ 4,100,000.00
Total	\$ 7,400,000.00

8. RESULTADOS:

Se revisó la historia clínica de 98 pacientes que fueron operados por neoplasia intraepitelial conjuntival con la técnica quirúrgica guiada por tinción con verde lisamina y la técnica quirúrgica convencional (sin verde lisamina) en clínica de oncología de la Fundación Oftalmológica Nacional entre el año 2017 y 2019.

Las características demográficas de la población total están descritas en la tabla 1. La media de edad para el total de pacientes fue de 57.8 años (rango de 26-82 años), la media de edad en el grupo con verde lisamina fue de 58 años (rango de 26-82 años) mientras que para el grupo sin verde lisamina fue de 57.5 años (rango de 30-79 años).

La distribución con respecto al género en el grupo con verde lisamina fue de hombres 51% y mujeres 49%, en el grupo sin verde lisamina fue de hombres 42.9% y mujeres 57.1%.

Las características clínicas oftalmológicas de la población total están descritas en la tabla 2. La lateralidad del ojo afectado fue mayor en el ojo izquierdo para ambos grupos, siendo en el grupo con verde lisamina de 46.9% en el derecho y 53.1% en el izquierdo, mientras que en el grupo sin verde lisamina fue de 44.9% en el derecho y 55.1% en el izquierdo.

En la mayoría de los casos las neoplasias ocuparon 3 meridianos de extensión con referencia al limbo corneal en ambos grupos, siendo un 59.2% en el grupo con verde lisamina y 49% en el grupo sin verde lisamina; así también el compromiso corneal fue frecuente en ambos grupos, con 93.9% en el grupo con verde lisamina y 95.5% en el grupo sin verde lisamina.

La tinción con fluoresceína en el examen clínico previo a la cirugía fue similar en ambos grupos y la tinción fue positiva para la mayoría de pacientes, con 93.9% en el grupo con verde lisamina y 91.8% en el grupo sin verde lisamina.

En el 100% de los pacientes de ambos grupos se uso la crioterapia como tratamiento coadyuvante en la resección de la neoplasia, mientras que en el 50% del total pacientes se uso la tinción intraoperatorio de verde lisamina, de estos pacientes la mayoría presento diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial conjuntival severa, siendo en 81.6% en el grupo con verde lisamina y 93.9% en el grupo sin verde lisamina, y se uso la técnica de plastia libre para cubrir el defecto conjuntival en el 98% de los pacientes de ambos grupos. En el análisis histopatológico de la neoplasia resecada quirúrgicamente de ambos grupos, se encontró que en el grupo de verde lisamina los bordes libres fueron del 98% y en el grupo sin verde lisamina fue de 83.7% (Tabla 3).

Tabla 1. Características demográficas (n=98)

Variables	%	Media	Rango
Edad/años		57.8	26-82
Género H/M	46.9/53.1		

Tabla 2. Características oftalmológicas (n=98)

Variables	Valores	Porcentajes %
Lateralidad	Derecho/Izquierdo	45.9/54.1
Extensión de la lesión	Meridianos 1, 2 y 3	18.4/27.6/54.1
Compromiso corneal	Sí/No	94.9/5.1
Tinción con fluoresceína	Sí/No	92.9/3.1
Uso de crioterapia	Sí	100
Recubrimiento plastia libre	Sí/No	98/2
Histopatología	Leve/Moderado/Severo	3.1/9.2/87.8

Tabla 3. Estado de los bordes de resección en histopatología (n=98)

		Bordes		Total	
		Libres	Comprometidos		
Tinción VL	Sí	Recuento	48	1	49
		Porcentaje	98,0%	2,0%	100,0%
		% del total	49,0%	1,0%	50,0%
	No	Recuento	41	8	49
		Porcentaje	83,7%	16,3%	100,0%
		% del total	41,8%	8,2%	50,0%

VL = Verde lisamina

Análisis Bivariado

El uso de tinción de verde lisamina intraoperatorio se asoció con una mayor proporción de bordes libres en el resultado de histopatología en pacientes operados por neoplasia intraepitelial conjuntival, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (p 0,031).

Tabla 4. Análisis bivariado

Bivariado	Variable	Test	Significancia
	Compromiso de bordes Sí/No	Fisher	0,031

9. DISCUSIÓN:

El verde lisamina es un colorante ácido-orgánico que puede usarse para la tinción vital de la conjuntiva y córnea (12), se ha descrito como una tinción segura, con pocos efectos adversos y sin toxicidad para la superficie ocular (12,13) Su utilidad se debe a que sirve como coadyuvante en el diagnóstico clínico, permite delimitar los bordes de neoplasias conjuntivales de manera eficaz y tiene buena tolerabilidad (10,24).

La descripción del uso de tinciones vitales en cirugía conjuntival es escasa, Kaji y cols. describieron un caso en Japón, en el cual se empleó azul de toluidina para la resección de carcinoma escamocelular difuso con el cual se permitió una adecuada delimitación de la neoplasia y su posterior resección completa con buenos resultados (14).

En la literatura, no hay publicaciones que describan el uso de verde lisamina como coadyuvante quirúrgico y su relación con los bordes de resección en las neoplasias intraepiteliales conjuntivales.

Este estudio provee información sobre el uso de verde lisamina como coadyuvante quirúrgico en un grupo de pacientes de un centro oftalmológico de referencia en Bogotá – Colombia y la proporción de bordes de resección comprometidos al compararse con la técnica quirúrgica convencional.

Los datos demográficos encontrados en este estudio fueron similares a los encontrados en el estudio de Shields y col. en el 2016 quienes describieron las características demográficas de 5002 pacientes en Estados Unidos (16); la edad en este último fue dividido por grupos etáreos y el mayor porcentaje de pacientes se encontraban alrededor de los 60 años, la distribución del género fue diferente en el estudio de Shields, con un 74% de hombres, mientras que en nuestro estudio fue de 46.9%.

La lateralidad del ojo afectado no es descrita con frecuencia en los estudios clínicos, debido a que esta no influye en las características clínicas de la neoplasia y su localización dependerá más de factores ambientales, como la exposición a la radiación ultravioleta.

La extensión de la lesión conjuntival la describimos de acuerdo a las zonas horarias que comprometía, tomando como referencia el limbo corneal. Encontramos que en la mayoría de los casos esta ocupaba 3 zonas horarias, conformando un cuadrante conjuntival, que con frecuencia correspondía a los cuadrantes más expuestos como lo son el nasal y temporal, hallazgo similar encontrado por Shields y col, quienes describieron que las neoplasias intraepiteliales conjuntivales se encontraban con mayor frecuencia en el cuadrante nasal 42% y temporal 41%.

El compromiso corneal fue un hallazgo frecuente en nuestro estudio y en el de Shields y col, estos últimos encontraron compromiso en un 88% de los pacientes, mientras que en nuestro grupo fue del 94.9% para el total de pacientes.

La tinción vital de fluoresceína sódica, al igual que la verde lisamina, tiñe células desvitalizadas o defectos del epitelio corneo-conjuntival, pero requiere de un filtro de luz

especial (azul de cobalto) para resaltar los lugares de tinción y por su menor contraste sobre la superficie conjuntival, no se observa bien en lesiones localizadas en este tejido (9,10); por eso no se usó como coadyuvante para demarcar las lesiones conjuntivales en el intraoperatorio de este estudio. Nuestro grupo de pacientes fue evaluado previamente al proceso quirúrgico en la consulta de oncología ocular y un 92.9% presentó tinción positiva con fluoresceína.

El 100% de pacientes recibió crioterapia durante el procedimiento quirúrgico, este se ha descrito como coadyuvante para reducir el número de recaídas, sobre todo en pacientes que hayan presentado bordes de resección comprometidos (4,6,25).

Se ha descrito el autoinjerto de conjuntiva, deslizamiento conjuntival o el uso de membrana amniótica para cubrir el defecto conjuntival producido por la escisión quirúrgica de la neoplasia, ambas técnicas con buenos resultados (4,6,8); en nuestro estudio el 98% de los pacientes fue operado con autoinjerto de conjuntiva y 2% con deslizamiento conjuntival, ya que el uso de membrana amniótica implicaría un gasto adicional al sistema de salud y no tendría mayor beneficio en estos pacientes.

El 87.8% de los pacientes presentó un grado de displasia severa en el examen de histopatología y esto se debe a que conforme la enfermedad progresa, las células se van diferenciando cada vez menos y al ser una enfermedad asintomática los pacientes son diagnosticados e intervenidos en estadios más tardíos (26).

En la mitad de los pacientes de este estudio se usó el verde lisamina con la finalidad de delimitar mejor los bordes de la neoplasia y resecar completamente el tumor. El 98% de los pacientes presentó bordes de resección libres, mientras que el 2% tuvo los bordes de resección comprometidos; por otro lado, en el resto de los pacientes, en los cuales no se usó el verde lisamina como coadyuvante intraoperatorio, el 83.7% presentó bordes de resección libres y el 16.3% bordes comprometidos, presentando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.031$) al comparar estas dos proporciones. No podemos comparar los resultados de este estudio con otros debido a que no están reportados en la literatura.

La tinción de verde lisamina se aplicó 3-4 minutos antes de la cirugía usando una presentación de solución en frasco de gotas; la experiencia con el verde lisamina fue de ser una tinción segura para usar en procedimientos quirúrgicos, durante el intraoperatorio y en el seguimiento de los pacientes no se presentaron molestias ni reacciones adversas.

Debido a la facilidad en el acceso, seguridad, uso y resultados positivos del verde lisamina, como coadyuvante quirúrgico en la resección de neoplasias conjuntivales, recomendamos su uso en los casos en donde clínicamente es difícil distinguir los límites de la lesión, con la finalidad de optimizar los resultados quirúrgicos.

Nuestro estudio tiene 2 limitaciones importantes. La primera es que, en el análisis histopatológico del tumor resecado, no se analizan todos los bordes de resección, esto sería técnicamente imposible debido a la extensión del tumor en el análisis histopatológico. El análisis se realizó de acuerdo a los estándares y técnicas internacionales, en donde se toman bordes aleatorios y representativos de cada sector de la muestra histopatológica. La segunda limitación es la naturaleza retrospectiva de este estudio. Un ensayo controlado aleatorizado nos podría brindar resultados con mayor control e impacto.

En conclusión, se encontró una menor proporción de bordes comprometidos en los resultados de histopatología de los pacientes operados por la técnica guiada por verde lisamina comparado con la técnica quirúrgica convencional y esta diferencia fue estadísticamente significativa.

10. REFERENCIAS:

1. Shields CL, Chien JL, Surakiatchanukul T, Sioufi K, Lally SE, Shields JA. Conjunctival Tumors: Review of Clinical Features, Risks, Biomarkers, and Outcomes—The 2017 J. Donald M. Gass Lecture. *Asia-Pacific J Ophthalmol*. 2017;6(2):109–20.
2. Shields CL, Shields JA. Tumors of the conjunctiva and cornea. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(1):3–24.
3. Moon CS, Nanji AA, Galor A, McCollister KE KC. Surgical versus medical treatment of ocular surface squamous neoplasia: A cost comparison. *Ophthalmology*. 2016;123(3):497–504.
4. Galor A, Karp CL, Oellers P, Kao AA, Abdelaziz A, Feuer W, et al. Predictors of ocular surface squamous neoplasia recurrence after excisional surgery. *Ophthalmology*. 2012;119(10):1974–81.
5. Tabin G, Levin S, Snibson G, Loughnan M, Taylor H. Late recurrences and the necessity for long-term follow-up in corneal and conjunctival intraepithelial neoplasia. *Ophthalmology* [Internet]. 1997;104(3):485–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(97\)30287-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(97)30287-5)
6. Campos LM, Abrahao MM, Teixeira LP, Nassaralla AA, Nassaralla BRA. Excision, cryotherapy and mitomycin C for the treatment of conjunctival-corneal intraepithelial neoplasia. *Rev Bras Oftalmol*. 2016;75(5):391–5.
7. Murthy R, Gupta H, Krishnatry R, Laskar S. Electron beam radiotherapy for the management of recurrent extensive ocular surface squamous neoplasia with orbital extension. *Indian J Ophthalmol*. 2015;63(8):672–4.
8. Nanji AA, Moon CS, Galor A, Sein J, Oellers P, Karp CL. Surgical versus medical treatment of ocular surface squamous neoplasia: A comparison of recurrences and complications. *Ophthalmology*. 2014;121(5):994–1000.
9. Eom Y, Lee JS, Keun Lee H, Myung Kim H, Suk Song J. Comparison of conjunctival staining between lissamine green and yellow filtered fluorescein sodium. *Can J Ophthalmol*. 2015;50(4):273–7.
10. Korb DR, Herman JP, Finnemore VM, Exford JM, Blackie C a. An evaluation of the efficacy of fluorescein, rose bengal, lissamine green, and a new dye mixture for

- ocular surface staining. *Eye Contact Lens*. 2008;34(1):61–4.
11. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottós J, Dib E, et al. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(5):576–617.
 12. Berntsen D a, Mitchell GL, Nichols JJ. Reliability of grading lissamine green conjunctival staining. *Cornea*. 2006;25(6):695–700.
 13. Hamrah P, Alipour F, Jiang S, Sohn J-H, Foulks GN. Optimizing evaluation of Lissamine Green parameters for ocular surface staining. *Eye*. 2011;25(11):1429–34.
 14. Kaji Y, Hiraoka T, Oshika T. Vital staining of squamous cell carcinoma of the conjunctiva using toluidine blue. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(6):825–6.
 15. Cicinelli MV, Marchese A, Bandello F, Modorati G. Clinical Management of Ocular Surface Squamous Neoplasia: A Review of the Current Evidence. *Ophthalmol Ther* [Internet]. 2018;7(2):247–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40123-018-0140-z>
 16. Shields CL, Alset AE, Boal NS, Casey MG, Knapp AN, Sugarman JA, et al. Conjunctival Tumors in 5002 Cases. Comparative Analysis of Benign Versus Malignant Counterparts. The 2016 James D. Allen Lecture. *Am J Ophthalmol*. 2017;173:106–33.
 17. Basti S, Macsai MS. Ocular surface squamous neoplasia: a review. *Cornea*. 2003;22(7):687–704.
 18. Pagán Carrasco S, Arranz Maestro D. Interferón alfa-2B tópico como primera opción terapéutica en un caso clínico de neoplasia intraepitelial córneo-conjuntival. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2017;92(9):442–6.
 19. Iovieno A, Longo C, De Luca M, Piana S, Fontana L, Ragazzi M. Fluorescence Confocal Microscopy for Ex Vivo Diagnosis of Conjunctival Tumors: A Pilot Study. *Am J Ophthalmol*. 2016;168:207–16.
 20. Gichuhi S, Macharia E, Kabiru J, Zindamoyen a. M, Rono H, Ollando E, et al. Toluidine blue 0.05% vital staining for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia in Kenya. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(11):1314–21.
 21. Ong SS, Vora GK, Gupta PK. Anterior Segment Imaging in Ocular Surface Squamous Neoplasia. *J Ophthalmol*. 2016;2016.
 22. Besley J, Pappalardo J, Lee GA, Hirst LW, Vincent SJ. Risk factors for ocular surface squamous neoplasia recurrence after treatment with topical mitomycin c and

- interferon alpha-2b. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(2):287-293.e2.
23. Finger P. Topical mitomycin chemotherapy for malignant conjunctival and corneal neoplasia. *Br J Ophthalmol.* 2006;90:807–9.
 24. Bayyat G Al, Arreaza-kaufman D, Venkateswaran N, Galor A, Karp CL. Update on pharmacotherapy for ocular surface squamous neoplasia. 2019;1–12.
 25. Crim N, Forniés-paz ME, Urrets-zavalía JA. In situ carcinoma of the conjunctiva : surgical excision associated with cryotherapy. *Clin Ophthalmol.* 2013;1889–93.
 26. Mittal R, Rath S, Vemuganti GK. Ocular surface squamous neoplasia – Review of etio-pathogenesis and an update on clinico-pathological diagnosis. *Saudi J Ophthalmol.* 2013;27(3):177–86.