



Depósito Legal: ppi201302ME4323
ISSN: 2343-595X



Revista Venezolana de Investigación Odontológica de la IADR

<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio>



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Fibrina inyectable con ácido hialurónico como sistema de liberación intradérmica. Ensayo preclínico en modelo murino

Dubraska Suárez

<https://orcid.org/0000-0003-1648-417X>

Gladys Velazco

<https://orcid.org/0000-0002-0571-8519>

Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Autora de correspondencia: Gladys Velazco. E-mail: gvelazcoula@gmail.com

Fibrina inyectable con ácido hialurónico como sistema de liberación intradérmica. Ensayo preclínico en modelo murino

RESUMEN

Historial del artículo

Recibo: 07-01-23

Aceptado: 01-02-23

Disponible en línea: 01-06-23

Palabras clave:

Ácido hialurónico, Fibrina rica en plaquetas inyectable, Sistemas de liberación controlada, sistemas de liberación transdérmica, reestructuración cutánea.

INTRODUCCIÓN: En armonización orofacial los sistemas autólogos inyectables para liberación intradérmica (SLC) son una innovación. Podrían cargarse con activos como aminoácidos, o ácido hialurónico para potenciar su acción. El ácido hialurónico (AH) de baja reticulación se ha valorado ampliamente en la reestructuración cutánea, pero no hay evidencia que demuestre sus efectos cutáneos cuando se le administra en un SLC de fibrina rica en plaquetas inyectable (iPRF). **OBJETIVO:** Evaluar histomorfométricamente la efectividad del SLC iPRF- AH versus AH en la reestructuración cutánea. **METODO:** Se administraron vía intradérmica los tratamientos en 13 ratas BIOU Wistar divididas en grupo control-control (3), grupo experimental iPRF + AH (5) y grupo control AH (5). A las 4 semanas se obtuvieron muestras cutáneas para ulterior análisis histológico. Los hallazgos fueron analizados mediante estadística descriptiva en el SPSS V19. **RESULTADOS:** El AH, no mostró infiltrado inflamatorio, cambios celulares reactivos, ni reacción inflamatoria a cuerpo extraño. Mostró escasos folículos pilosos (80%) y vasos sanguíneos (20%), tejido conectivo laxo (80%) con fibras colágenas tipo I separadas (60%) y algunas fragmentadas (20%), escaso edema intercelular (60%), número de fibroblastos moderado (80%), epidermis delgada con membrana basal ondulante (100%) y grosor dérmico moderado (80%). En iPRF+AH tampoco se observó infiltrado inflamatorio, reacción a cuerpo extraño o cambios celulares reactivos. Mostró escasos vasos sanguíneos (20%), escasos folículos pilosos (100%), tejido conectivo laxo con fibras colágenas delgadas y fragmentadas (80%), moderado volumen intercelular (80%), celularidad de fibroblastos moderada (60%), epidermis delgada con membrana basal ondulante (100%) y grosor dérmico delgado (60%). **CONCLUSIONES:** El iPRF+ AH genera menor bioestimulación de los fibroblastos que AH control, por lo que la mejor calidad de las fibras colágenas fue observada con el AH sin conjugar. iPRF+ AH conduce a un considerable mayor volumen intercelular, benéfico para propósitos de hidratación pues no está asociado a respuesta inflamatoria o cambios celulares. El SLC iPRF+AH evita la respuesta inflamatoria tardía y restringe la alopecia observada al administrar AH. Se recomienda estudiar el comportamiento del sistema iPRF +AH en modelos envejecimiento cutáneo avanzado.

Injectable fibrin with hyaluronic acid as an intradermal release system. Intradermic. Preclinical trial in a murine model

ABSTRACT

BACKGROUND: In orofacial harmonization, autologous injectable systems for intradermal release (AIS) are an innovation. They could be loaded with active ingredients such as amino acids or hyaluronic acid to enhance their action. Low cross-linked hyaluronic acid (HA) has been widely appreciated in skin resurfacing, but there is no evidence demonstrating its cutaneous effects when administered in an injectable platelet-rich fibrin (iPRF) SLC. **AIM:** To evaluate histomorphometrically the effectiveness of iPRF- HA versus HA SLC in skin restructuring. **METHOD:** Treatments were administered intradermally in 13 BIOU Wistar rats divided into control-control group (3), iPRF + AH experimental group (5) and AH control group (5). At 4 weeks skin samples were obtained for further histological analysis. The findings were analyzed by descriptive statistics in SPSS V19. **RESULTS:** The HA did not show inflammatory infiltrate, reactive cellular changes, nor inflammatory reaction to foreign body. It showed scarce hair follicles (80%) and blood vessels (20%), lax connective tissue (80%) with separated type I collagen fibers (60%) and some fragmented (20%), scarce intercellular edema (60%), moderate number of fibroblasts (80%), thin epidermis with undulating basement membrane (100%) and moderate dermal thickness (80%). iPRF+AH also showed no inflammatory infiltrate, foreign body reaction or reactive cellular changes. It showed sparse blood vessels (20%), sparse hair follicles (100%), lax connective tissue with thin and fragmented collagen fibers (80%), moderate intercellular volume (80%), moderate fibroblast cellularity (60%), thin epidermis with undulating basement membrane (100%) and thin dermal thickness (60%). **CONCLUSIONS:** iPRF+ HA generates less fibroblast biostimulation than control HA, so the best collagen fiber quality was observed with unconjugated HA. iPRF+ HA leads to considerably higher intercellular volume, beneficial for hydration purposes as it is not associated with inflammatory response or cellular changes. The iPRF+AH SLC prevents the late inflammatory response and restricts the alopecia observed when HA is administered. It is recommended to study the behavior of the iPRF+AH system in models of advanced skin aging.

MeSH: Hyaluronic acid, injectable platelet-rich fibrin, controlled release systems, transdermal release systems, skin restructuring.

Introducción

Entre las estrategias con base científica para la renovación cutánea se halla la inyección intradérmica de activos biomiméticos, cuyo éxito reside en la bioestimulación celular directa, enfoque novedoso dirigido al reemplazo epidérmico, a la inducción percutánea de colágeno y a la reposición de los elementos fundamentales del estroma celular para la revitalización

celular, la reestructuración y redensificación dérmica, lo cual ayuda a revertir surcos y rítdes, elastosis y dermatoheliosis de la piel, contribuyendo con la regeneración cutánea facial¹.

Algunos de estos activos para la liberación transdérmica son agentes que promueven y acortan mecanismos biológicos de revitalización, reestructuración y redensificación cutánea. La mayoría de estos activos de liberación transdérmica incorporan sustancias biológicamente activas como aminoácidos, ácido hialurónico, silicio, ácido lipoico, entre otros para estos fines ^{2,3}, siendo de especial interés en esta investigación el ácido hialurónico no reticulado (AH).

El Ácido Hialurónico, es el glicosaminoglicano más simple. Es un polímero producido naturalmente en el cuerpo humano en los líquidos vítreo y sinovial, cordón umbilical y tejidos conectivos ^{4,5}. y participa también en varias funciones fisiológicas como la regulación del sangrado, la inflamación, la promoción de la regeneración ósea y la curación de los tejidos ⁶.

El Ácido Hialurónico es higroscópico (capaz de retener una gran cantidad de agua —miles de veces su peso), una propiedad viscoelástica que contribuye al mantenimiento de la estructura y el volumen del tejido, la rigidez estructural y al llenado de espacios⁷, por lo cual el volumen de HA es fundamental en el soporte estructural de la piel.

El AH sintético no reticulado es un biomaterial inyectable cuyo efecto en la bioestimulación celular cutánea ha sido ampliamente estudiado con éxito, pero su vida media suele ser ultracorta, de 1 a 2 días en la epidermis, biodegradación a cargo de las enzimas hialuronidasas⁸; por lo cual es un reto prolongar su acción local.

Ahora bien, nos hallamos ante una nueva era de la estética facial. Aun cuando se sigue indicando el relleno subdérmico con ácido hialurónico, existe una nueva comprensión de la fisiopatología del envejecimiento facial, que implica recordar que los tejidos que integran el macizo orofacial están organizados por estratos y que al envejecer cada estrato experimenta cambios a diferentes ritmos, con injerencia sobre los demás tejidos. Este nuevo paradigma redirigió las pautas de tratamiento, para la reposición de los tejidos lo más cercano a su ubicación original, a través de adipoestructuración, dermosustentación, ritidoreversión compensatoria y la cutaneoregeneración⁹.

La ritidoreversión se puede definir como el conjunto de estrategias dirigidas a la reversión de la ritidosis cutánea que ha permanecido remanente pese haber realizado tratamientos de reposición de los tejidos. Se puede compensar la ritidosis mediante estrategias de

bioestimulación celular, reestructuración tisular y redensificación dérmica a fin de lograr una verdadera reversión de las ríides y no simplemente rellenar espacios de volumen perdidos¹⁰.

Por lo cual el empleo de scaffolds o andamios bioactivos inyectables como sistemas de liberación intradérmica podría aportar un valor inigualable en la tarea de renovar el tejido cutáneo para alcanzar la ritidoreversión. No obstante, hasta el momento no hay ningún sistema inyectable comercial para la liberación intradérmica que contenga activos cosmeceúticos como el ácido hialurónico, aun cuando numerosas investigaciones ^{8,11, 12, 13, 14} han demostrado la capacidad del ácido hialurónico para actuar como scaffold o andamio para la ingeniería de tejidos.

Por otra parte, los polímeros empleados para la construcción de los sistemas de liberación controlada suelen ser sintéticos. Afortunadamente existen matrices bioactivas de origen autólogo que superan esta desventaja como el iPRF, que podría representar un posible nuevo sistema de liberación que puede ser inyectado en el tejido cutáneo cumpliendo con un doble papel, ser reservorio para la liberación intradérmica controlada del medicamento cosmeceútico y liberar sustancias biológicas que promuevan la bioestimulación celular local, induciendo la renovación del tejido.

El iPRF es un excelente andamiaje o vehículo fluido¹⁵, cuyo análisis ultraestructural indica que podría permitir la entrega controlada del AH mientras ejerce un efecto regenerativo sinérgico¹⁶ por su mayor cantidad de sustancias bioactivas¹⁷, mayor al PRP y otros concentrados de plaquetas¹⁸, moléculas de capital interés en los procesos regenerativos orofaciales.

El iPRF ha sido ampliamente estudiado en la última década como sistema para la bioestimulación celular¹⁹, ha sido empleado con carga biomateriales y sustancias útiles en la regeneración tisular en tejidos duros y blandos orofaciales^{20, 21,22} demostrando superar los efectos adversos de los biomateriales de relleno²³⁻²⁶ como la formación de granuloma e infecciones crónicas o retardadas, comunes en los procedimientos de reestructuración orofacial²⁷.

Considerando las propiedades físico-químicas y biológicas reportadas para el AH y la fibrina rica en plaquetas inyectable, se planteó el desarrollo y estudio de un andamio de iPRF cargado con AH. Este andamio nanoliberador podría emplearse no solo para la reestructuración cutánea sino expandir su interés a la curación avanzada de heridas, su infiltración para restituir la reconexión nerviosa en patologías como lesiones del nervio dentario inferior, lesiones de la articulación temporomandibular como la retrodisquitis entre otras lesiones tratables con este sistema.

Sin embargo, luego de una búsqueda de evidencia científica sobre ensayos clínicos o preclínicos controlados al respecto, se constató que no hay publicaciones científicas sobre la respuesta cutánea a la liberación intradérmica del AH mediante fibrina rica en plaquetas inyectable como vehículo bioactivo y aun cuando se puede teorizar sobre su posible mecanismo de acción al inyectarse, todavía se desconocen sus efectos tisulares concretos.

Para llenar este vacío se propuso como objetivo general: Evaluar histomorfométricamente la efectividad de un andamiaje de iPRF-AH en la reestructuración cutánea.

Su cumplimiento se alcanzó a través de los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la administración intradérmica del Ácido Hialurónico no reticulado sobre la reestructuración cutánea en modelo murino.
- Describir el efecto cutáneo del SLC intradérmico Ácido hialurónico-Fibrina rica en plaquetas inyectable.
- Comparar los resultados obtenidos en cada uno de los grupos estudiados.

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación fue conducida bajo el enfoque cuantitativo, es de tipo correlacional, con un diseño experimental, estipulándose un experimento puro de diseño con posprueba y grupo control-control, descriptivo. La variable independiente corresponde a los tratamientos de liberación intradérmica con AH e iPRF + AH que fueron suministrados para analizar las consecuencias que tiene sobre la reestructuración tisular (cambios histológicos en la epidermis y en la dermis), la cual representa la variable dependiente.

Se utilizó una muestra homogénea en cuanto a línea, sexo, edad y peso corporal, constituida por 13 ratas adultas jóvenes machos de al menos 12 semanas de edad de la línea BIOU: Wistar, con peso corporal comprendido entre 250 y 350 g, provenientes del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA).

Se consideró necesario la realización de este estudio preclínico en un modelo murino para valorar los efectos del fármaco cosmeceútico puesto que es reciente su posicionamiento en el mercado. Constituye una estrategia confiable, que garantiza el control e influencia de variables externas, permitiendo predecir el comportamiento farmacocinético, farmacodinámico, pues la muestra de ratas Wistar no solo es homogénea en cuanto a consanguinidad, sexo, edad y peso corporal, sino que esta especie y cepa ha sido anteriormente estudiada como modelo de envejecimiento en

pruebas de fármacos y protocolos terapéuticos de sustancias y células dirigidas a terapias en estética por la similitud biológica del tejido dérmico de estos ejemplares con la dermis en humanos^{27,28,29}.

Procedimiento

Los grupos que componen el ensayo, fueron divididos en:

- **Grupo A (Grupo control-control, n=3):** a este grupo no se le administró tratamiento.
- **Grupo B (Grupo Control, n=5):** a este grupo se le administró 0,02 mL del AH, dosis única.
- **Grupo C (Grupo Experimental, n=5):** a este grupo se le administró 0,02 mL de AH mezclado con iPRF, dosis única.

Los 3 grupos se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales y de alimentación. La identificación de los animales que conformaron los grupos a evaluar se realizó por marcaje de la cola en aros con diferentes colores, uno para cada grupo, cuyo número de aros identificó a cada animal. Durante el período experimental, se mantuvieron en jaulas individuales y posteriormente se separaron en 3 grupos según el grupo (control-control, control y experimental).

Además, este ensayo preclínico honró el Código de Ética del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias intermedias de la República Bolivariana de Venezuela y el proyecto fue evaluado por la comisión de bioética de BIOULA obteniéndose el aval número CE BIOULA/123 para ejecutar la investigación.

Para asegurar la viabilidad, confiabilidad y cumplir con las normas bioéticas también se realizó una prueba piloto, constituida por 2 ratas adultas macho de la línea BIOU: Wistar, con un peso entre 250 y 350 g. Se desarrolló en las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Los Andes y consistió en la ubicación de la zona anatómica fuera del alcance del animal para evitar rascado o cualquier lesión, hallándose que la zona más idónea era el área entre las escápulas. Se probaron 3 dosis de los productos, para hallar la dosis idónea de acuerdo a la capacidad elástica del tejido cutáneo en la rata, así como la técnica de inyección adecuada para el nivel dermoepidérmico, resultando la técnica micropapular la más adecuada para no comprometer la vascularización del área.

Administración de los tratamientos

Los tratamientos fueron cargados en jeringas de 1 mL con aguja descartable. El cálculo de la dosis se realizó haciendo extrapolación de la cantidad máxima a administrar por cada depósito en el área cervicofacial según las indicaciones clínicas, entendiendo que por vía intradérmica se suelen emplear dosis mínimas para cumplir con el principio mesoterapéutico de baja dosis.

Previa depilación del área dorsal, se delimitó la zona a infiltrar mediante marcaje con un diámetro aproximado de 1cm. Posteriormente se infiltró vía pápula intradérmica 0.02ml de ácido hialurónico en los especímenes control y el mismo volumen de AH con iPRF fue administrado en el grupo experimental. La profundidad exacta de inyección de 4mm fue asegurada empleando para la punción agujas hipodérmicas 30g x 4mm. La infiltración se realizó con sedación inhalatoria leve con halotano con ayuda de otro operador especializado en manejo de pequeños animales de experimentación para lograr la inmovilización atraumática del animal (**Figura 1**).

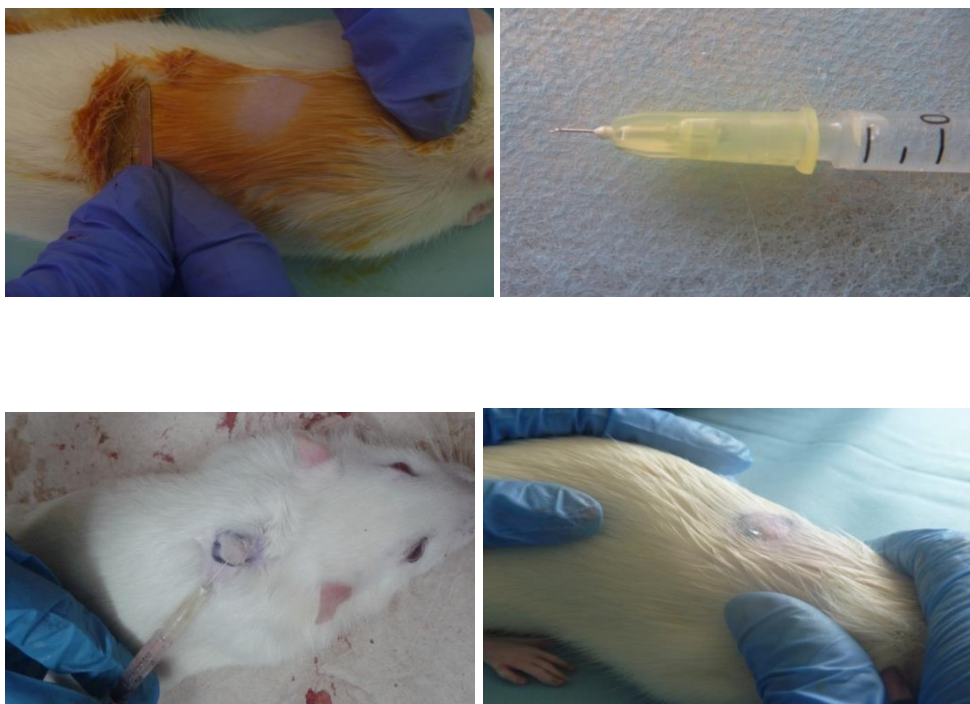


Figura 1. Infiltración vía pápula intradérmica

A las 4 semanas de intervención se sacrificaron los animales mediante la utilización de sobredosis anestésica inhalatoria con eflourano. Mediante disección cutánea del área marcada se obtuvieron las muestras para la valoración histológica, conservándoles en formalina al 12% en envases cerrados e identificados. (**Figura 2**)

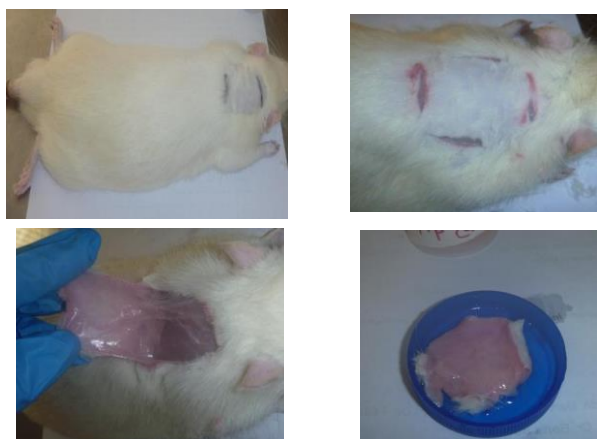


Figura 2. Eutanasia y obtención de las muestras.

Posteriormente se realizó el estudio histológico, en el cual las muestras fijadas se colocaron en casetes identificados e introducidas en la batería de alcoholes para deshidratación, luego fueron sumergidas en el agente aclarante y posteriormente fueron embebidas en parafina se llevaron a la estufa a 56°C por 2 horas. Cada bloque de parafina se seccionó con el micrótopo obteniéndose de 3 a 6 cortes de 0,5 micras (**Figura3a**). Los cortes resultantes se montaron en portaobjetos y se introdujeron en la estufa 2 horas para desparafinarlas. (**Figura 3b**).

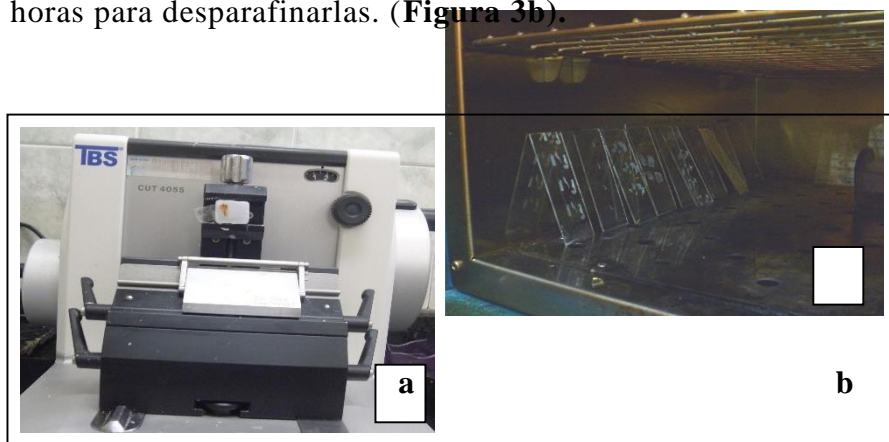
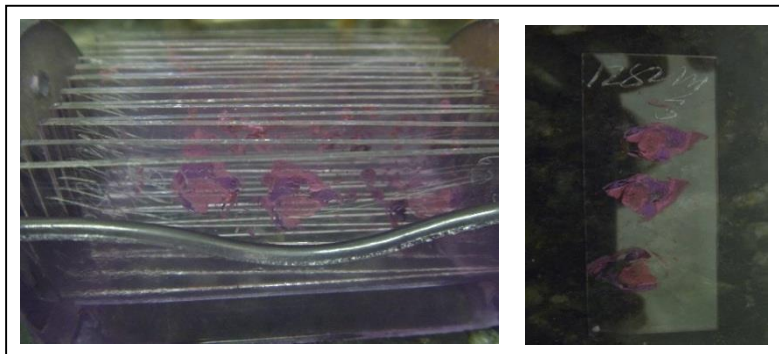


Figura 3. a. Corte de la parafina para el montaje. b. Láminas en la estufa de calor seco.

Se realizó la coloración con hematoxilina-eosina y montaje de los preparados histológicos. Se usó como medio de montaje el Martex® y se colocaron los



cubreobjetos sobre todos los preparados histológicos (**Figura 4**).

Figura 4. Preparados histológicos

El procedimiento de inspección de las láminas de los preparados se llevó a cabo usando un microscopio óptico de doble cabeza para permitir la observación del autor y el experto simultáneamente. Un primer vistazo para la familiarización y calibración de los observadores y una segunda ronda de observaciones para el llenado del instrumento. Se fotografiaron los cortes guardándose las imágenes digitalizadas para la interpretación de los resultados.

Recolección de datos, aspectos bioéticos y procesamiento estadístico

La técnica de recolección de datos empleada para este estudio fue la observación indirecta, para determinar por análisis histomorfométrico las características del tejido tratado con el activo solo y en combinación con el iPRF. Asimismo, se trató de una observación estructurada, puesto que se utilizaron instrumentos detallados y categóricos que permitieron registrar estructuradamente la presencia o ausencia de los diferentes indicadores e igualmente el grado en que se manifestaron algunos de estos.

Para ello se empleó una ficha de registro de hallazgos histológicos previamente validada por 2 especialistas en histopatología, instrumento de recolección de datos en donde se plasmó la información relacionada con las categorías de los parámetros histológicos que quedaron establecidos por la opinión experta de la siguiente forma:

1. Tejido conjuntivo (laxo y Denso)
2. Edema intercelular (Ausente, escaso, moderado, elevado)

3. Cambios celulares (Ausente y Presente)
4. Infiltrado inflamatorio crónico (Ausente, escaso, moderado, elevado)
5. Reacción de tipo a cuerpo extraño (Ausente y Presente)
6. Vasos sanguíneos (ausente, escasos [$<$ a 3 vasos sanguíneos x campo], moderado [$>$ a 4], elevado [$>$ de 7])
7. Folículos pilosos (ausente, escasos [$<$ a 4 folículos pilosos x campo], moderado [$>$ a 4], elevado [$>$ de 7])
8. Calidad y densidad de fibras colágenas (fibras colágenas gruesas y entrelazadas, fibras colágenas delgadas y separadas, fibras colágenas fragmentadas o degeneradas)
9. Celularidad de Fibroblastos (Ausente, escasa [$<$ 10 células X campo], Moderada [$>$ a 10 células X campo], Elevada [$>$ de 20 células X campo])
10. Grosor epidérmico (epitelio delgado y membrana basal ondulante, delgado y membrana basal rectificada, grueso y membrana basal rectificada, grueso y membrana basal ondulante)
11. Grosor dérmico (delgado grosor [ocupa 1/4 del diámetro del campo], moderado grosor [2/4 del diámetro del campo], elevado grosor [3/4 del diámetro del campo])

Una vez recolectada la información, para realizar el análisis se empleó el paquete estadístico SPSS versión 19, en el cual fueron vaciados los resultados obtenidos de la observación histológica para su posterior análisis mediante medidas estadísticas descriptivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posterior a las 4 semanas de infiltrarse los tratamientos en las 13 ratas, se realizó la eutanasia para el análisis histopatológico de los grupos en comparación. Se caracterizaron algunos cortes de las 3 ratas pertenecientes al grupo control-control, a fin de ser empleados como referencia como el patrón de normalidad para el contraste para correspondiente el contraste con los grupos control y experimental. A continuación, se muestran los hallazgos de las microfotografías de los cortes control-control.

HALLAZGOS GRUPO CONTROL-CONTROL (grupo de referencia, sin inyectar)

La piel de los especímenes de la cepa inoculada en este estudio se caracteriza por un epitelio delgado estratificado plano cuya membrana basal es ondulante formando depresiones o crestas epidérmicas de corta amplitud, así como papilas dérmicas de semejante amplitud como se puede apreciar en la **Figura 5**.

Así mismo, el grosor de la dermis se midió desde la membrana basal o unión dermoepidérmica al inicio del tejido subcutáneo subyacente, ocupando de acuerdo a su extensión promedio aproximadamente 2/4 partes del campo en 40x (**Figura 5**). Este grosor se consideró un grosor moderado y fue el parámetro para establecer otros niveles de grosor en los grupos de estudio.

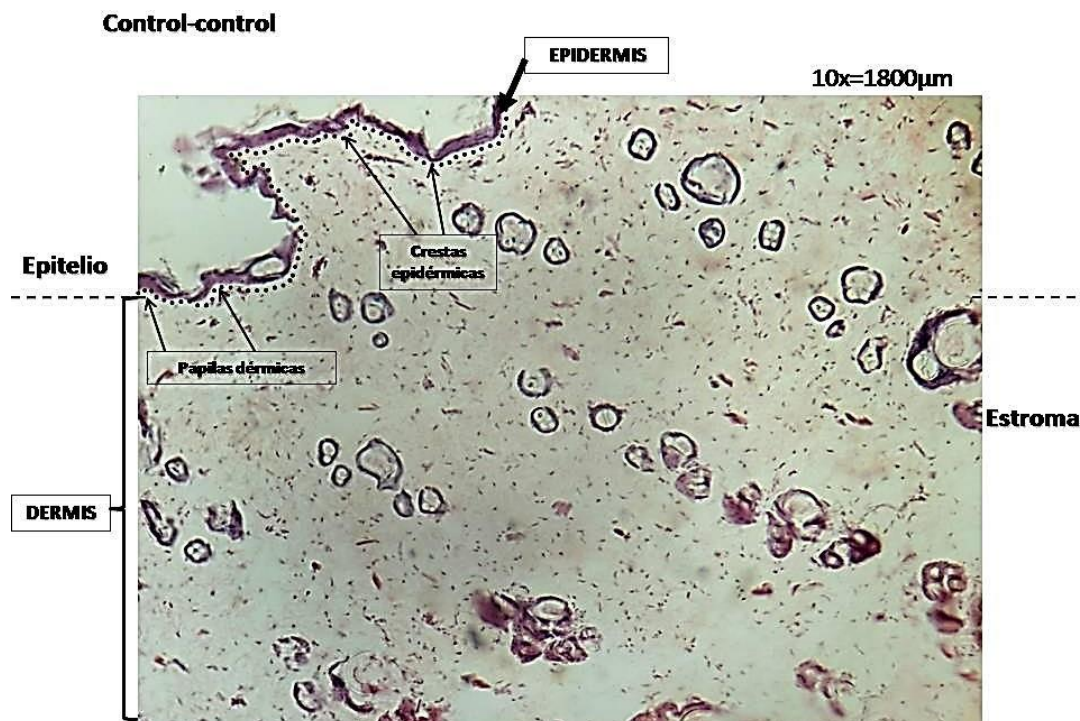


Figura 5. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Se identifica la morfología típica del epitelio (epidermis) y estroma (dermis) en el grupo control-control en la línea BIOU: Wistar

Destacan múltiples unidades pilosebáceas (referencial de 5 folículos pilosos en promedio por campo de 40x) que macroscópicamente le otorgan el aspecto piloso en

el pelaje animal y un variado número de glándulas sudoríparas (**Figura 6**). Estas últimas no fueron contabilizadas por no aportar datos o variaciones significativas dentro de los parámetros a valorar.

Además, la celularidad de fibroblastos en dermis ronda por una población de alrededor de 20 fibroblastos por campo de 40x (**Figura 6**), lo cual fue tomado en cuenta al igual que otros parámetros para contrastar como referencia con los hallazgos del grupo control y experimental.

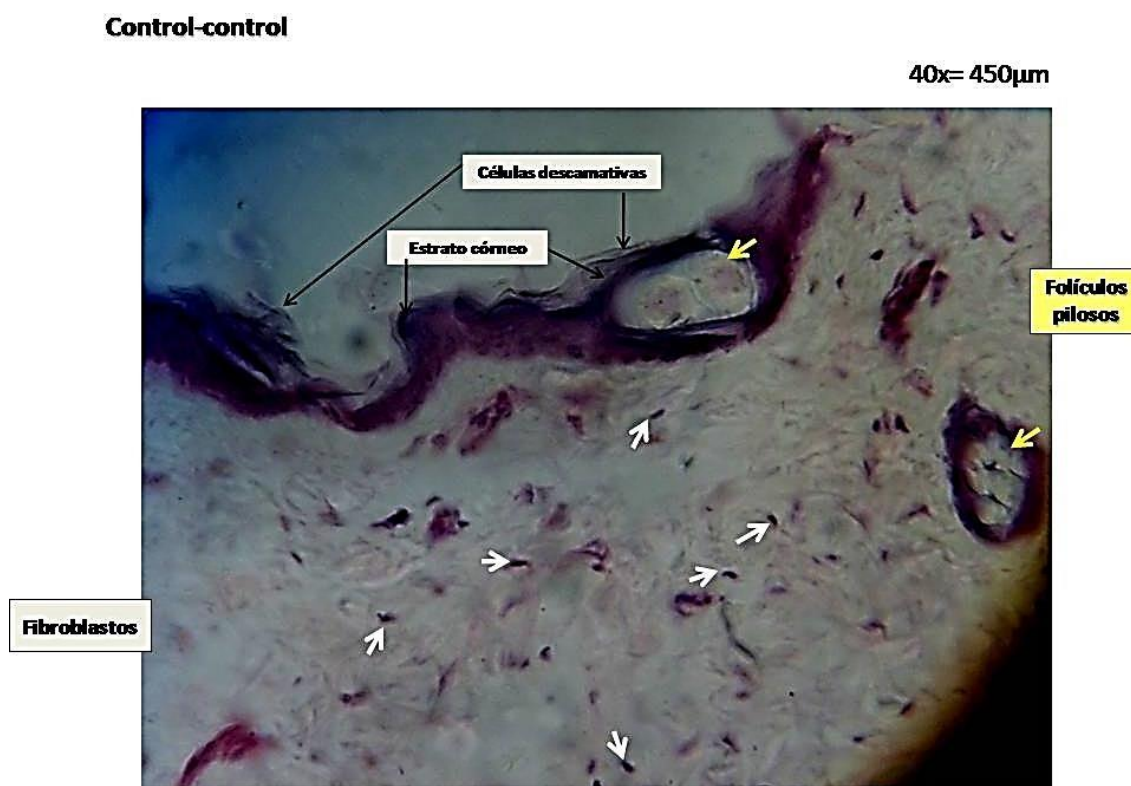


Figura 6. Microfotografía de corte histológico de piel grupo control-control de la línea BIOU: Wistar teñido con H-E (40x). Se identifican estrato córneo con sus células descamativas, fibroblastos, unidades pilosebáceas en dermis y un folículo en segundo plano detrás en la epidermis.

El estroma está constituido por un tejido conectivo denso y organizado, sin infiltrado inflamatorio y con presencia de escasos vasos sanguíneos (aproximadamente 3 vasos sanguíneos por campo de 40x) que le aportan nutrición (**Figura 7**).

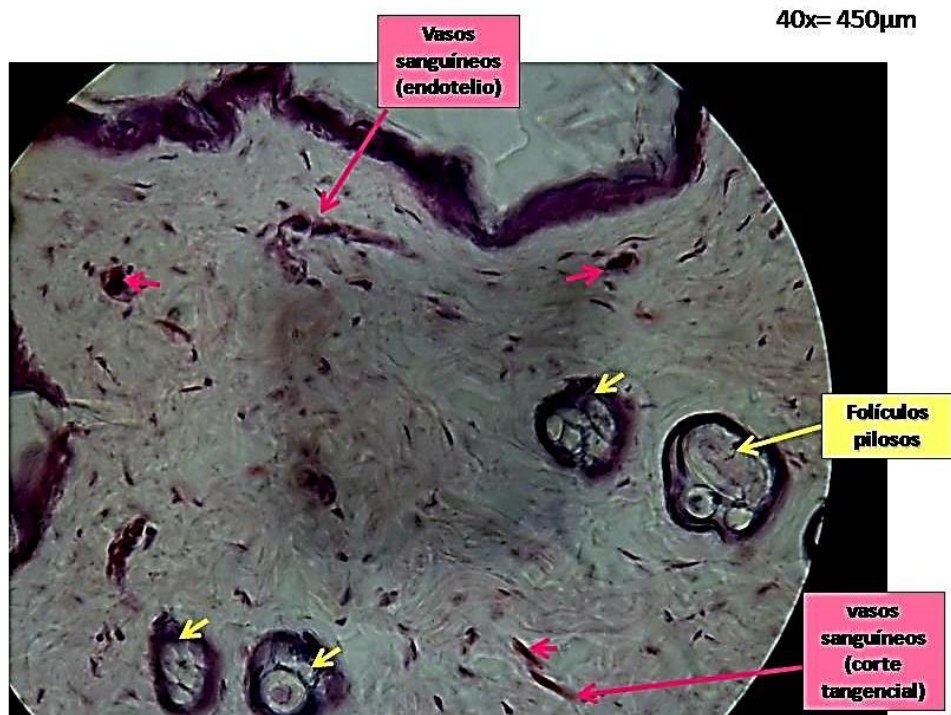
Control-control

Figura 7. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Morfología típica del conectivo denso del grupo control-control en la línea BIOU: Wistar

Las fibras colágenas del estroma papilar son delgadas y con discreta separación entre ellas, mientras que el estroma reticular muestran mayor grosor, con menor distancia entre fibras y mayor entrecruzamiento en contraste con algunas bandas colágenas robustas y compactas (**Figuras 7 y 8**). Estos hallazgos coinciden con las características de la dermis en ratas adultas de 3 meses de edad de una investigación previa que identificó fibroblastos grandes, una matriz extracelular bien organizada, mostrando haces de colágeno compactos y orientados regularmente³⁰.

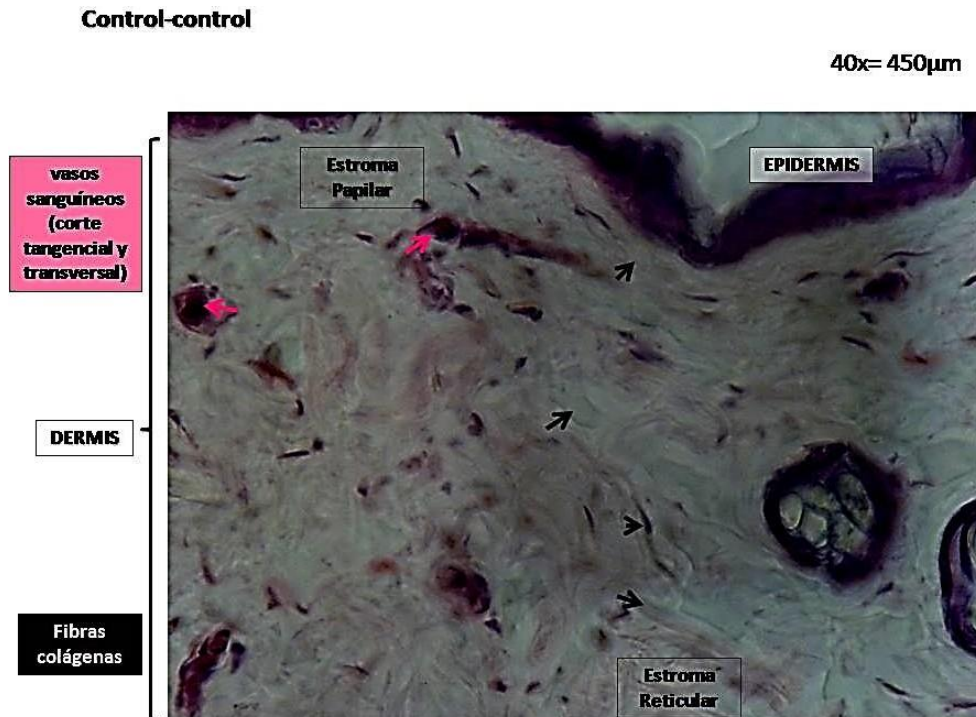


Figura 8. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Morfología de las fibras colágenas en el grupo control-control de la línea BIOU: Wistar

Al no contar con insumos y condiciones para inducir envejecimiento en el modelo murino empleado en este estudio, se tomaron como referencia los parámetros de publicaciones científicas previas que estudian el envejecimiento cutáneo en ratas, como la de Jankovic et al³⁰ quienes en 2019 señalan que los principales cambios cutáneos a nivel histológico y molecular en la rata envejecida obedecen a alteraciones oxidativas que generan engrosamiento de la epidermis, alteraciones morfológicas del estrato basal, desaparición de interqueratinocitos y uniones, manchas perinucleares vacías entre los queratinocitos, espacios vacíos inter e intracelulares en toda la epidermis, desaparición de la lámina basal y unión dermoepidérmica.

Además, la matriz dérmica suele ser avascular con rarefacción y número reducido de fibroblastos, se torna más desorganizada con agrandamiento de los haces de colágeno con reducido espacio interfibrilar, pero mal orientados. Hay baja capacidad de renovación de la piel por alteraciones mitocondriales evidente en los queratinocitos, fibroblastos y mastocitos³⁰. Estos cambios son extrapolables a piel humana, dado que

se ha conocido que los cambios microestructurales relacionados con la edad son muy similares en la piel humana y murina³¹.

A partir de las imágenes referenciales del ensayo piloto parte de esta investigación y la calibración con experto en el área, se lograron analizar los parámetros hallados en los grupos control y experimental, cuyos resultados se muestran seguidamente.

Hallazgos grupo Control (MATRIX) vs. Experimental (MATRIX + iPRF)

Tipo de tejido conectivo

El estroma en ambos grupos fue predominantemente laxo (**gráfico 1**), rico en fibras de colágeno tipo I, abundantes fibras de elastina, característico de un tejido que macroscópicamente es más elástico y organizado.

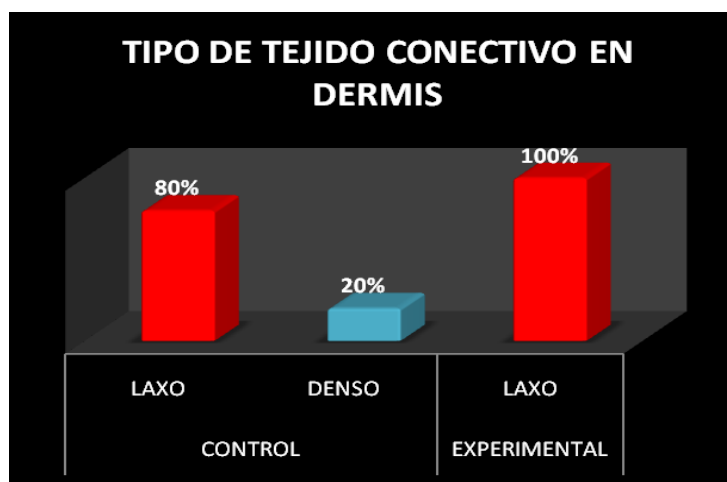


Gráfico 1. Tipo de conectivo en las muestras en estudio.

Esta laxitud del conectivo observada en ambos grupos (**Figura 9**) es atribuida a que el activo Matrix contiene mayoritariamente ácido hialurónico, el cual es un glicosaminoglicano parte fundamental de la matriz extracelular en el tejido conectivo. Es una molécula larga con una gran capacidad de hidratación, aportando a los tejidos resistencia a presiones mecánicas y lubricación, pero también otras funciones relacionadas con la comunicación y diferenciación celular.

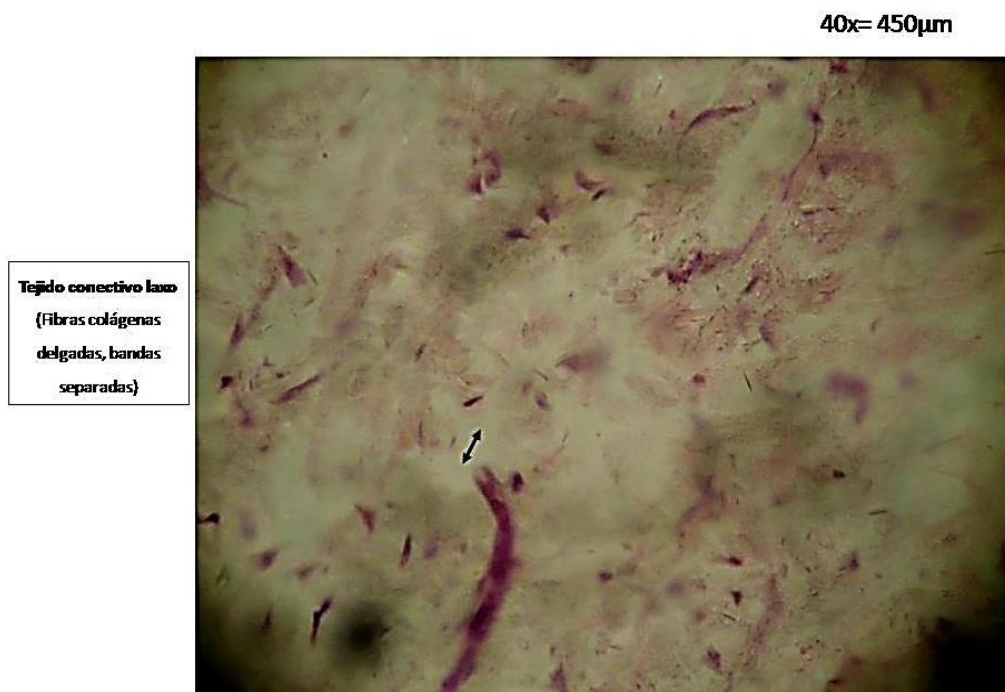


Figura 9. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Tejido conectivo laxo en las muestras de ambos grupos de estudio.

La capacidad de surtir de hidratación al tejido proviene de su capacidad de asociarse a moléculas de agua, por sus cargas negativas en su estructura molecular. Por su tamaño, el pobre plegamiento de su estructura y a su capacidad hidrofílica, ofrece un gran espacio acuoso en su interior favoreciendo la difusión de moléculas no muy voluminosas a través de esos espacios³².

Volumen intercelular

Es posible que esta hidratación propiciada por las moléculas de ácido hialurónico por medio de su capacidad higroscópica generó un volumen mayor de sustancia fundamental en el estroma al combinarse con el iPRF, como se denota en el **gráfico 2** que indica que en el grupo experimental se elevó el volumen intradérmico en el 80% de los casos.

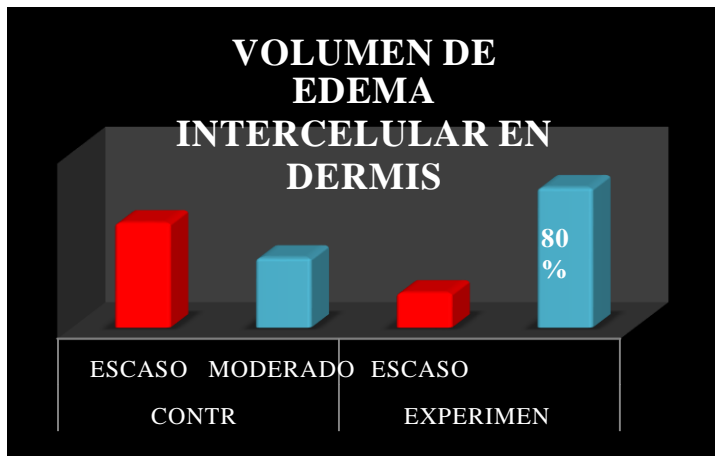


Gráfico 2. Edema dérmico en los grupos de estudio.

Atipia celular y reacción inflamatoria.

Si bien hubo incremento de volumen dérmico no se trató de un volumen patológico proveniente de un proceso inflamatorio crónico puesto que en ninguno de los dos grupos no se registraron cambios celulares reactivos (**Tabla 1**), ni reacción inflamatoria a cuerpo extraño (**Tabla 2**) y tampoco se detectó infiltrado inflamatorio crónico (**Tabla 3, Figura 10**).

Tabla 1. Cambios celulares o atipias experimentadas en epidermis o dermis

Grupo			Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje	
	Válidos	Ausente			Válido	Acumulado
Control	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0
Experimental	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0

Tabla 2. Respuesta inflamatoria a cuerpo extraño

Grupo			Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido	Porcentaje Acumulado
Control	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0
Experimental	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0

Tabla 3. Infiltrado inflamatorio crónico en estroma

Grupo			Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido	Porcentaje Acumulado
Control	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0
Experimental	Válidos	Ausente	5	100.0	100.0	100.0

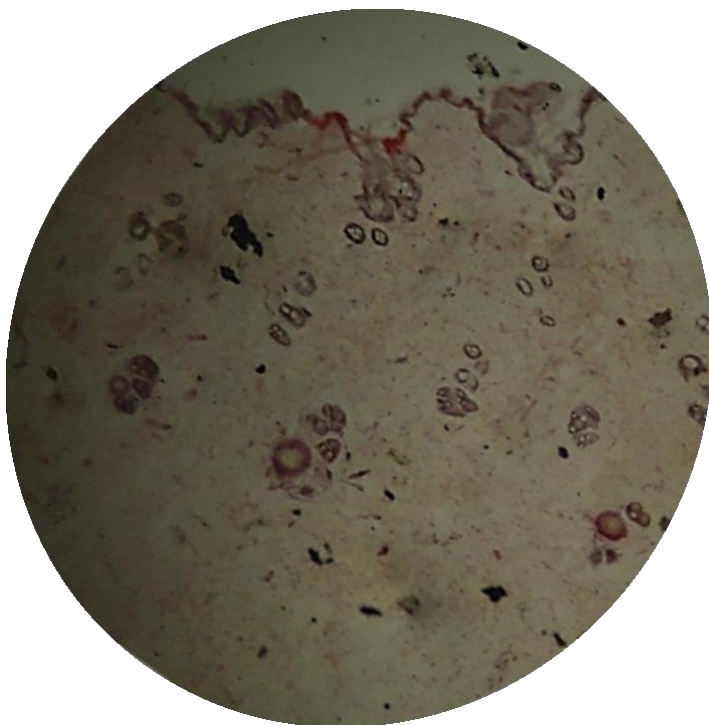


Figura 10. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Representa a la ausencia de infiltrado inflamatorio en ambos grupos de estudio.

Entonces estos resultados de ausencia de proceso inflamatorio, confirman que en lugar de pensarse en un edema patológico, este incremento de volumen registrado con mayor frecuencia en el grupo experimental ciertamente es un aumento de sustancia fundamental que clínicamente podría surtir de mayor hidratación a la piel, luminosidad, tono cutáneo o dermosustentación, pues puede contribuir a revertir la profundización de surcos y rítdes cutáneas, por un efecto físico-mecánico y por efecto biológico aumenta la señalización celular y su mayor biodisponibilidad local serviría de sustrato para la síntesis de fibras, de matriz extracelular, propiciando la reestructuración tisular.

Folículos pilosos

El ácido hialurónico forma parte natural del cuero cabelludo y es una sustancia fundamental para el crecimiento de las células de la papila dérmica en las unidades pilosebáceas³³. No obstante el conteo señala un predominio de escasos folículos en

ambos grupos (menor o igual a 4 Folículos pilosos por campo, **Gráfico 3**) que puede interpretarse como una alopecia incipiente.

Aunque hay evidencia de que el AH puede provocar alopecia, ésta realmente se produce como consecuencia de un compromiso vascular, ya sea por un volumen de relleno excesivo que provoca un taponamiento vascular o por una embolización de AH que conduce a una oclusión intravascular; ambos resultan en hipoxia tisular³⁴.

Los escasos folículos observados pudieran deberse a la actividad catágena transitoria ejercida por el incremento de volumen intradérmico que presiona sobre las unidades pilosebáceas, lo cual no es preocupante, pues son cambios funcionales reversibles al no encontrarse un proceso cicatricial que comprometa la viabilidad de las unidades pilosebáceas.

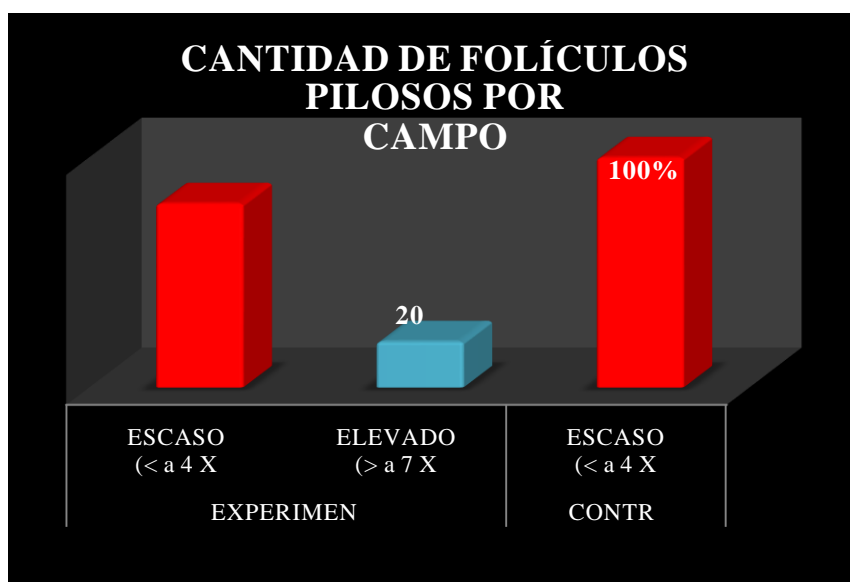


Gráfico 3. Conteo de folículos en los grupos de estudio.

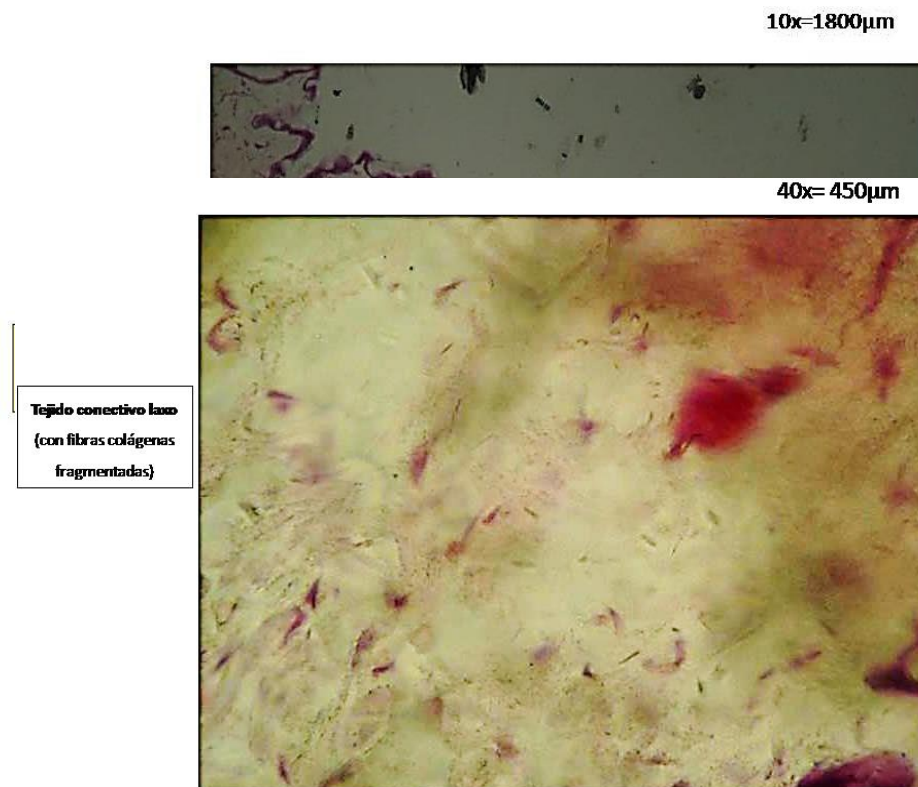


Figura 11. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Se identifican folículos pilosos escasos en corte tangencial. Imagen representativa en ambos grupos de estudio.

Calidad de las fibras colágenas

Llama la atención la aparente degeneración colágena en ambos grupos (**Figura 12**) con predominio en el grupo experimental (80% de fibras fragmentadas) en contraste con la presencia de fibras colágenas gruesas y entrelazadas en un 60% de las muestras controles (**gráfico 4**).

La asociación de ácido hialurónico no reticulado con iPRF parece generar un volumen superior de sustancia amorfa que activar las colagenasas en el medio, generando fragmentación fibrilar, aun cuando la evidencia científica disponible apunta a lo contrario, que la mezcla de AH con concentrados plaquetarios es beneficiosa puesto que los factores contenidos en el PRP aumentan la elasticidad dérmica al activar la eliminación de componentes de la matriz extracelular deteriorados por fotodaño e inducir la síntesis de nuevo colágeno por parte de los fibroblastos dérmicos³⁵.

Figura 12. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (40x). Se identifican fibras colágenas fragmentadas. Imagen representativa en ambos grupos de estudio.

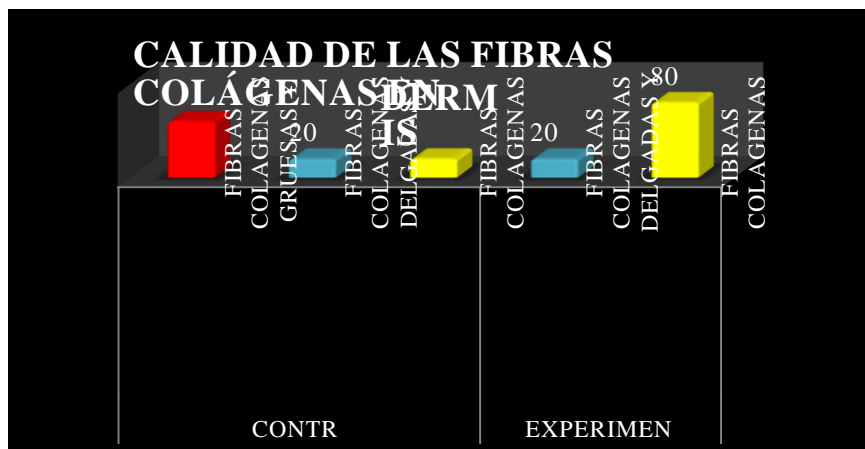


Gráfico 4. Calidad de las fibras colágenas en estroma en grupos control y experimental

Proliferación de fibroblastos

Coincidentemente la población de fibroblastos fue mayor en el grupo control AH (80%) (**gráfico 5, Figura 13**) que en el grupo experimental iPRF-AH (60%) (**gráfico 5, Figura 14**), lo cual también explica en parte la menor formación colágena por parte de estas células que fue observado en el resultado anterior acerca de las fibras colágenas.

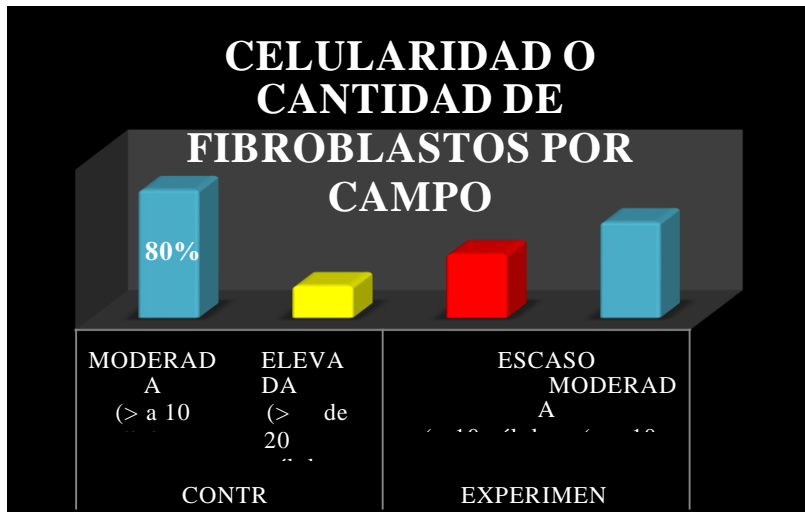


Gráfico 5. Conteo de fibroblastos en ambos grupos de estudio.

Esta mayor población de fibroblastos observada cuando el AH es usado en mesoterapia se debe a que este producto es bioactivo actuando de forma pasiva gracias a su composición bioquímica, pero también actúa como molécula de señalización, pues modula efectivamente la migración y la adhesión celular de los fibroblastos de la piel humana mediante eventos de señalización celular propiciados por un grupo de proteínas de unión llamadas hialadherinas de matriz y hialadherinas celulares³⁶. Se ha determinado que promueve la viabilidad de los fibroblastos cutáneos (+ del 15%) y aumenta la expresión génica del colágeno tipo I y la elastina en 9.7 veces y 14 veces, detectado mediante la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa³⁷.

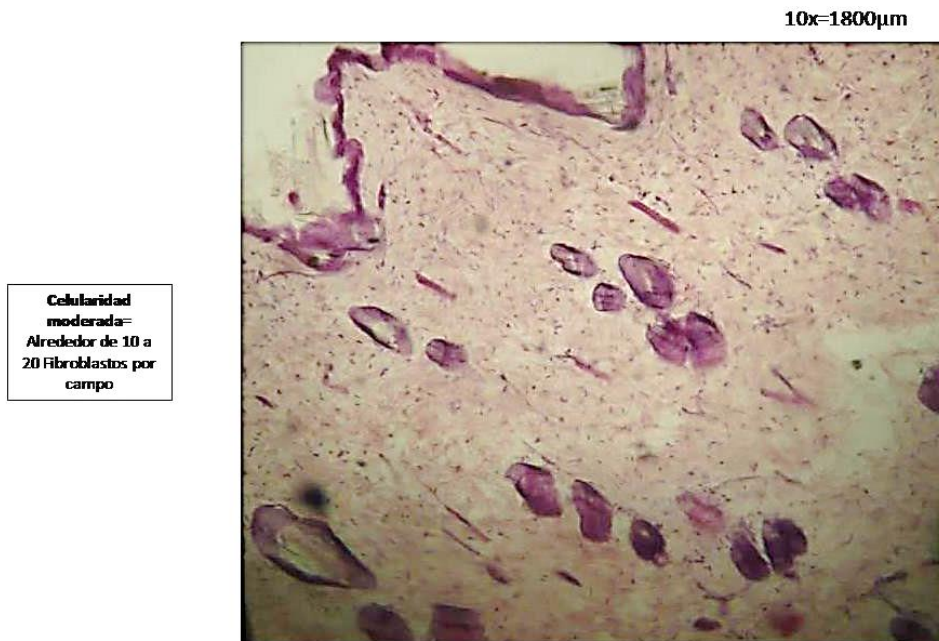


Figura 13. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x) grupo control. Se identifica celularidad de fibroblastos moderada.

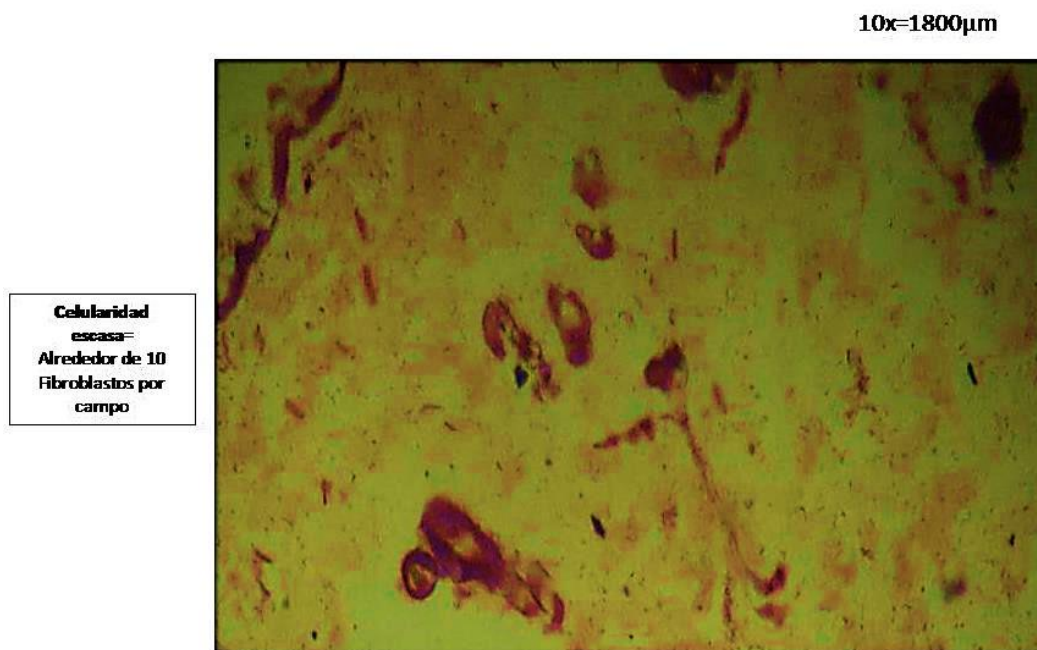


Figura 14. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x) grupo experimental. Se identifica celularidad de fibroblastos escasa.

Grosor epidérmico y estado de la membrana basal.

La membrana basal de la epidermis no se rectificó ni en grupo experimental ni en el control (**Figura 15**) debido a que la reestructuración cutánea se logró a expensas de la incorporación de un volumen discreto y no una redensificación dérmica por colagenización, por ello en ambos grupos la membrana basal es ondulante (**Tabla 4**) con mayor amplitud de la ondulación que la referencia observada en el grupo control-control de referencia comparativa.

Tabla 4. Grosor epidérmico y estado de la membrana basal en 10x y 40x

Grupo	Válidos	Delgado y membrana Basal ondulante	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido	Porcentaje Acumulado
Control	5	Delgado y membrana Basal ondulante	5	100.0	100.0	100.0
Experimental	5	Delgado y membrana Basal ondulante	5	100.0	100.0	100.0



Figura 15. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Se identifica membrana basal ondulante en control y experimental.

Grosor dérmico

El grosor moderado de la dermis (**Figura 16**) predominó en el grupo control (80%) en tanto que el grosor delgado (**Figura 17**) se mostró en el 60% del grupo experimental. El biotipo dérmico en cuanto al grosor puede ser asociado a la respuesta del tejido ante las sustancias inyectadas.

Aunque se sabe que los factores de crecimiento presentes en el andamio AH-iPRF (grupo experimental) propician una intensa remodelación del tejido cutáneo³⁵, el momento capturado en la observación microscópica puede corresponderse con un momento de reorganización tisular en el que hay menor celularidad.

En tanto que, el grupo control que fue tratado solo con el AH, puede exhibir una mayor superficie dérmica producto de una gran bioestimulación celular provista por el mismo AH, que tiene poderosa influencia en proliferación celular³⁸.

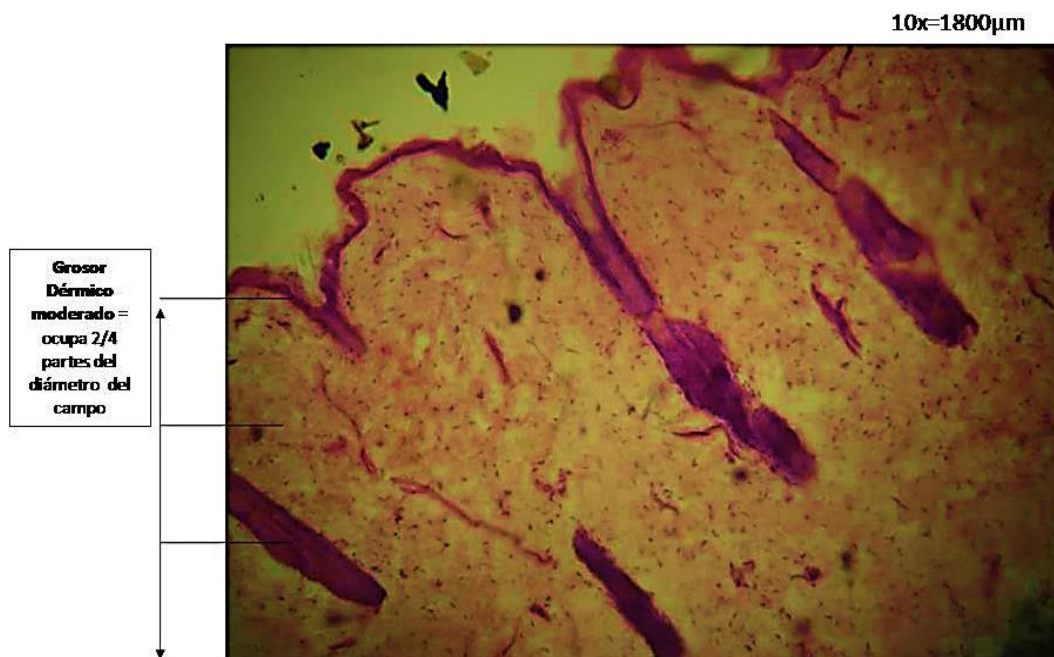


Figura 16. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Se identifica grosor de dermis moderado, prevaleciente en el grupo control.

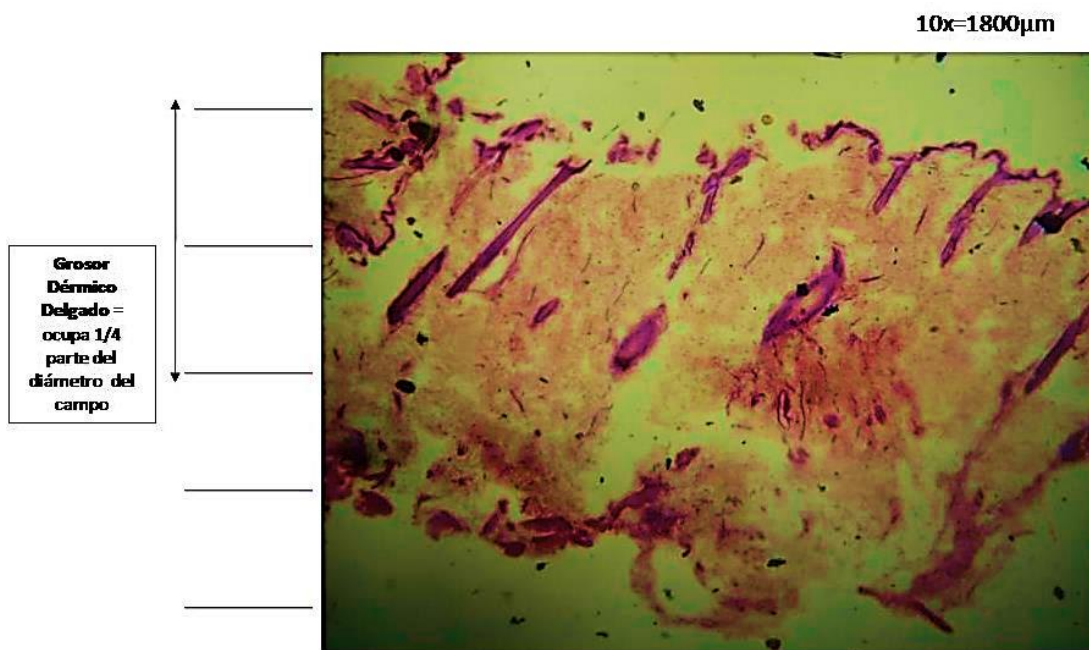


Figura 17. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Se identifica grosor de dermis delgado, prevaeciente en el grupo experimental.

Vasos sanguíneos en estroma

La persistencia de vasos sanguíneos solo se presentó en el 20% de los casos tanto en el grupo control como experimental (**Figura 18**) lo cual es igual a la cantidad de vasos sanguíneos hallados en la piel control o no intervenida de las ratas, por lo que es indicativo de una correcta respuesta del estroma en la fase tardía de reparación, donde desaparecen la mayor parte de vasos quedando solo los necesarios para aportar nutrición al tejido. En contraste el 80% de las muestras analizadas no se hallaron vasos sanguíneos (**Figura 19**), corroborando lo esperable en la fase tardía a la cual pertenece el período de evaluación de los grupos (**Gráfico 7**).

Sin embargo, se ha señalado que la combinación fibrina activada del PRP con AH induce a una secreción de niveles más altos de VEGF en las primeras horas hasta las 72 h, lo que sugiere un potencial angiogénico en este andamiaje³⁹. Esta actividad angiogénica no pudo ser valorada en el actual estudio puesto que no se realizaron eutanasias en las primeras 72 horas postratamiento.

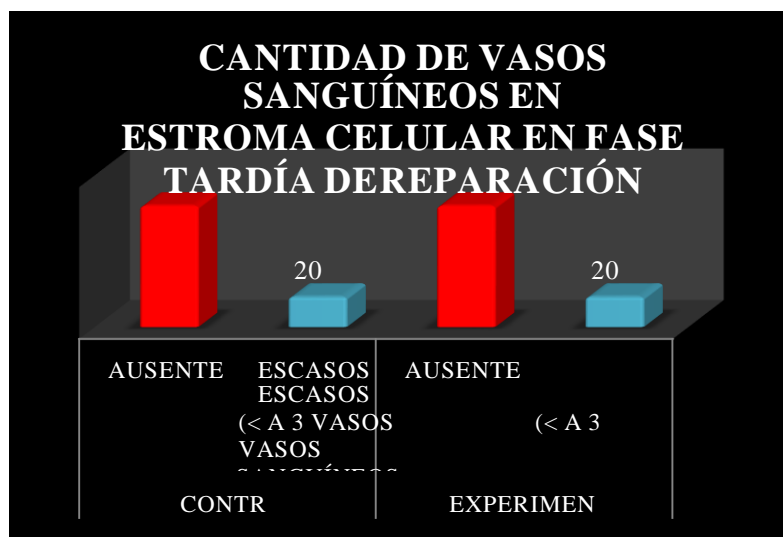


Gráfico 7. Conteo de vasos sanguíneos en los grupos en estudio.

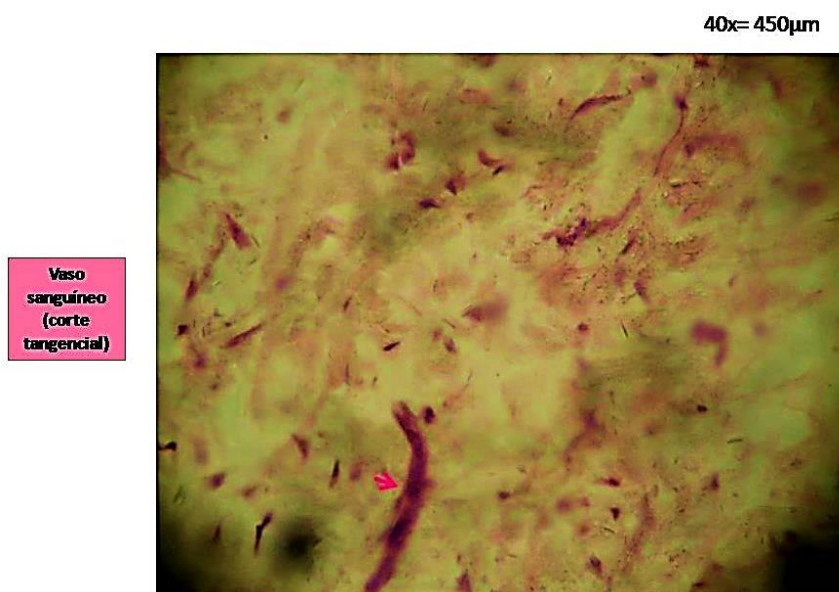


Figura 18. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Persistencia de vasos sanguíneos escasos en la dermis de ambos grupos.

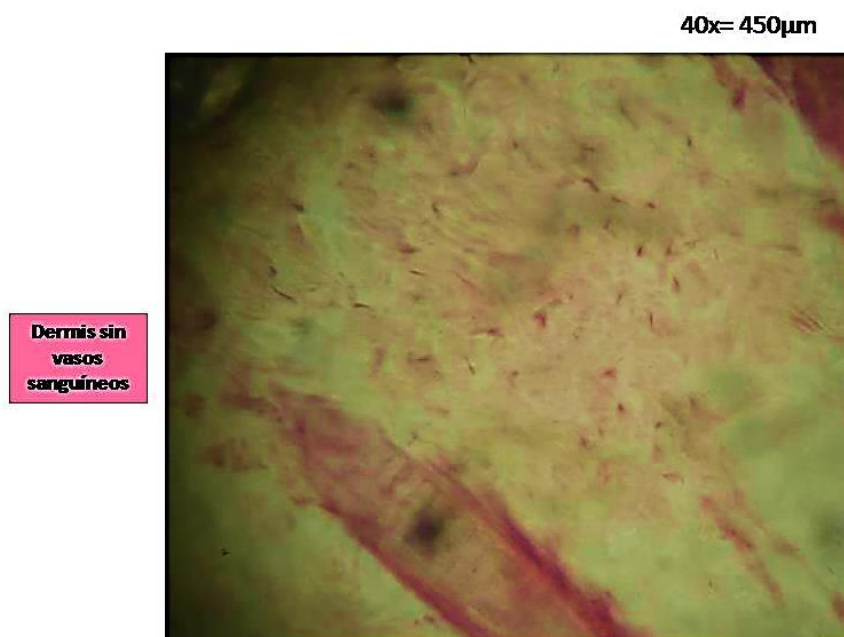


Figura 19. Microfotografía de corte histológico de piel teñido con H-E (10x). Dermis sin vasos sanguíneos, imagen prevaleciente en ambos grupos.

Sobre el potencial del scaffold AH-iPRF

Aun cuando no hay otros ensayos clínicos controlados o preclínicos específicos del empleo combinado de iPRF con AH no reticulado en intradermoterapia para discutir los resultados del presente estudio, si existen estudios que han valorado la viabilidad biológica y fisicoquímica del PRP con AH, un concentrado plaquetario con similitud al iPRF.

De acuerdo con los ensayos clínicos y los metaanálisis (los más altos niveles de evidencia científica) existentes sobre El PRP con AH, las principales aplicaciones clínicas de este combinado de PRP con AH están dirigidas al uso de scaffolds in vitro para proliferación celular e in vivo para la curación avanzada de úlceras crónicas⁴⁰, seguido de su empleo en la recuperación de la osteoartritis, la regeneración de defectos óseos postquirúrgicos en cráneo, para la reducción del dolor y la inflamación postquirúrgica en cirugía bucal⁴¹ y un amplio empleo en traumatología⁴²⁻⁴⁴.

En cuanto la bioestimulación dérmica, el área de interés del presente estudio, la mezcla de PRP con ácido hialurónico también ha sido ponderada como exitosa, por su efecto visible en la bioestimulación dérmica facial.

Algunos estudios evidencian resultados superiores en la ritidoreversión y mejora en las propiedades de la piel al inyectar AH mezclado con PRP. Se especula que su éxito reside en que el ácido hialurónico potencia la liberación de factores de crecimiento desde PRP en menor tiempo⁴⁵.

Otro autor introdujo la mezcla de 5cc de plasma con 0,5 cc% de gel de ácido hialurónico 3,5% y 0,5 cc de procaína, relatando resultados satisfactorios para el rejuvenecimiento facial a partir del primer tratamiento, lo cual sugiere que los tratamientos con HA y PRP pueden tener efectos sinérgicos. Se postula que el AH agregado al PRP proporciona un ambiente viscoso e hidratado ideal para las funciones del factor de crecimiento³⁵.

Los resultados de la actual investigación sugieren que los hallazgos positivos y superiores al inyectar AH + iPRF también se deben a un efecto sinérgico entre ambas sustancias en el tejido cutáneo, en la cual el andamio fluido no solo se comporta como un vehículo de liberación sino que es un verdadero sistema bioactivo que potencia el efecto del AH y a su vez es influenciado por el AH como un catalizador que potencia la liberación de factores de crecimiento en el entorno donde es inyectado el sistema.

El incremento de volumen registrado en el grupo experimental corresponde a un aumento de sustancia fundamental, más no un volumen patológico puesto que no existió infiltrado inflamatorio, por lo cual el andamio de liberación AH + iPRF, clínicamente podría surtir de mayor hidratación a la piel, luminosidad, tono cutáneo o dermosustentación, pudiendo contribuir a revertir la profundización de surcos y ríttides cutáneas, por un efecto mecánico ofrecido a través de este volumen y un efecto biológico propiciaría la señalización celular, pues el andamio de iPRF al contener el fármaco AH por más tiempo, genera mayor biodisponibilidad local de AH y de factores de crecimiento es un sustrato seguro para la síntesis de más ácido hialurónico nativo en la matriz extracelular, para la síntesis de fibras colágenas y elásticas, propiciando así la reestructuración cutánea.

CONCLUSIÓN

- El iPRF+ AH genera menor bioestimulación de los fibroblastos que cuando se inyecta AH no reticulado solo, por lo que se obtiene una mejor calidad de fibras colágenas cuando se usa el AH sin conjugar.
- El andamio iPRF+ AH conduce a un considerable mayor volumen intercelular, benéfico para propósitos de hidratación pues no está asociado a respuesta inflamatoria o cambios celulares.
- El SLC estudiado también evita la respuesta inflamatoria tardía y parece restringir la alopecia que se observó al administrar AH solo.
- Inyectar AH con iPRF, si resulta superior a inyectar AH de forma convencional, pues el propósito de este producto no es la redensificación dérmica por lo cual la respuesta de la colagenización sería secundaria y posiblemente tardía a cargo de los factores contenidos en el IPRF que si bioestimula a los fibroblastos.
- Se recomienda estudiar la velocidad y concentración de la liberación de AH desde sistema iPRF +AH mediante espectroscopía UV Vis, su compatibilidad biológica mediante microscopía electrónica y con estos datos diseñar un protocolo para inyectar en pieles fotoenvejecidas a fin de confirmar su utilidad clínica.
- El sistema AH+iPRF es un andamio nanoliberador que podría emplearse no solo para la reestructuración cutánea sino expandir su interés a la curación avanzada de heridas cutáneas y mucosas, con potencial de uso en Armonización Orofacial y Medicina Estomatológica.
- Su infiltración intraoral podría servir para restituir la reconexión nerviosa en patologías como lesiones del nervio dentario inferior o como biomaterial para la remodelación de la arquitectura gingival, proyectándose la papila gingival mediante su inyección progresiva, esto es importante en la Armonización Orofacial pues una sonrisa con triángulos negros desprovistos de encía interdental, no es estética.
- Además, podría emplearse en patologías de la articulación temporomandibular como la retrodisquitis inyectada extraoralmente, en el espacio articular superior, entre otras lesiones tratables con este sistema como la osteoartritis de la ATM.

Referencias

1. Fitzgerald R, Graivier MH, Kane M, Lorenc ZP, Vleggaar D, Werschler WP, Kenkel JM. Update on facial aging. *Aesthet Surg J*. 2010; 30 Suppl: 11S-24S. DOI: 10.1177/1090820X10378696.
2. Liu S, Chen Z, Cai X, Sun Y, Zhao C, Liu F, Liu D. Effects of dimethylaminoethanol and compound amino acid on D- galactose induced skin aging model of rat *Scientific World Journal*. 2014; 2014:507351. 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/507351>.
3. Murakami H, Shimbo K, Inoue Y, Takino Y, Kobayashi H. Importance of amino acid composition to improve skin collagen protein synthesis rates in UV-irradiated mice. *Amino Acids*. 2012; 42:2481–2489. DOI: 10.1007/s00726-011- 1059-z
4. D. Vasile, R. Iancu, C. Bogdanici, E. Ungureanu, D. Ciobotea, R. Ciuluvica, G. Iancu, *Chemophysical Properties and Biomedical Applications of Hyaluronic Acid in Medicine, Revista De Chimie* 2017; 68(2) 384-386.
5. A. Fakhari, C. Berkland, Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment, *Acta biomaterialia* 2013; 9(7): 7081-7092
6. G. Agarwal, S. Agiwal and A. Srivastava, Hyaluronic acid containing scaffolds ameliorate stem cell function for tissue repair and regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.107>
7. Kogan Grigorij, Šoltés Ladislav, Stern Robert, Schiller Jürgen, Mendichi Raniero. *Hyaluronic Acid: Its Function and Degradation in in vivo Systems. Studies in Natural Products Chemistry* 2008; 34: 789-882. DOI: 10.1016/S1572- 5995(08)80035-X.
8. A. Passi, D. Vigetti, *Hyaluronan: Structure, Metabolism, and Biological Properties, Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices, Springer*2019, pp. 155-186
9. Velazco de Maldonado GJ, Suárez-Vega DV, García-Guevara V, Miller-Kobisher B. Innovative Paradigm in Aesthetics Medicine: Proposal for Diagnostic Morphological Geometric by Thirds, *Semiology in Clinical Applied to Aging Facial. J Cutan Aesthet Surg*. 2020 Apr-Jun; 13(2):112-123. DOI: 10.4103/JCAS.JCAS_116_19. PMID: 32792772; PMCID: PMC7394105.
10. Suárez D, 2020. La ritidoreversión. Un fenómeno predecible. Editorial. *Acta Bioclínica*. Julio-Diciembre. 2021

Velazco G. & Suárez D. Fibrina inyectable con ácido hialurónico como sistema de liberación intradérmica. Ensayo preclínico en modelo murino *Rev Venez Invest Odont IADR*. 2023;11(1): 5-41.

11. M.A. Solis, Y.-H. Chen, T.Y. Wong, V.Z. Bittencourt, Y.-C. Lin, L.L. Huang, Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells, *Biochemistry research international* 2012 (2012) 346972.
12. J. Lam, N.F. Truong, T. Segura, Design of cell–matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds, *Acta biomaterialia*. 2014; 10(4): 1571-1580.
13. L. Liu, A Ballada A. Engineering of Polymers and Chemical Complexity: Current State of the Art and Perspectives: First Edition, Apple Academic Press; United State, 2014.
14. C. Chircov, A.M. Grumezescu, L.E. Bejenaru, Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering, *Rom. J. Morphol. Embryol* 2018; 59 71-76.
15. Choi SW, Pangen R, Jung DH, Kim SJ, Park JW. Construction and characterization of cell-penetrating peptide-fused fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for an enhanced percutaneous delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018; 18:842-847.
16. Choukroun J, Ghanaati S (Eds). Introducing the Low-Speed Centrifugation Concept. In *Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications: Biological Background and Clinical Indications*. First Ed. 2017. John Wiley & Sons <https://doi.org/10.1002/9781119406792.ch3>
17. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). *RCOE*. 2001; 6(3).
18. Andreone A and Hollander D. A Retrospective Study on the Use of Dermis Micrografts in Platelet-Rich Fibrin for the Resurfacing of Massive and Chronic Full-Thickness Burns. *Stem Cells International* .Volume 2019, Article ID 8636079, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2019/8636079>
19. Dohle E, El Bagdadi K, Sader R, Choukroun J, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:598-610
20. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2017; 21:1913-1927

21. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*. 2018; 6:1-12.
22. Nacopoulos C1, Vesala AM. Lower facial regeneration with a combination of platelet-rich fibrin liquid matrices based on the low speed centrifugation concept-Cleopatra technique. *J Cosmet Dermatol*. 2019. DOI: 10.1111/jocd.13196.
23. Kim DH, Je YJ, Kim CD, et al. Can platelet-rich plasma be used for skin rejuvenation? Evaluation of effects of platelet- rich plasma on human dermal fibroblast. *Ann Dermatol*. 2011; 23:424-431. 3.
24. Redaelli A. Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients. *J Drugs Dermatol*. 2010; 9:466-472.
25. Sclafani AP. Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds. *J Cosmet Dermatol*. 2010; 9:66-71. 5.
26. De Almeida C, Valiense H, Rodriguez E, N M, Mourao F, Calasans M. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i- PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*. 2015; 42(6).
27. Yao Xue Xue Bao. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose. *Acta pharmaceutica Sinica* 2017; 52(3):347-354
28. Fitzgerald R, Graivier MH, Kane M, Lorenc ZP, Vleggaar D, Werschler WP, Kenkel JM. Update on facial aging. *Aesthet Surg J*. 2010; 30 Suppl: 11S-24S. DOI: 10.1177/1090820X10378696.
29. Kema VH, Khan I, Jamal R, Vishwakarma SK, Lakki Reddy C, Parwani K, Patel F, Patel D, Khan AA, Mandal P. Protective Effects of Diallyl Sulfide Against Ethanol-Induced Injury in Rat Adipose Tissue and Primary Human Adipocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017; 41(6):1078-1092.
30. Jankovic A, Saso L, Korac A, Korac B. Relation of Redox and Structural Alterations of Rat Skin in the Function of Chronological Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2019, Article ID 2471312, 12 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/2471312>

31. Lynch B, Bonod-Bidaud C, Ducourthial G, Affagard JS, Bancelin S, Psilodimitrakopoulos S, Ruggiero F, Allain JM & Schanne-Klein MC. How aging impacts skin biomechanics: a multiscale study in mice. *Scientific Reports* 2017; 7: 13750. DOI:10.1038/s41598-017-13150-4
32. Csoka AB, Stern R. 2013. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ionic acid. *Glycobiology* 23:398-411
33. Fernández-Martos S, Calvo-Sánchez M, García-Alonso K, Castro B, Hashtroody B, Espada J. Sustained Human Hair Follicle Growth Ex Vivo in a Glycosaminoglycan Hydrogel Matrix. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 9;20(7):1741. DOI: 10.3390/ijms20071741. PMID: 30970537; PMCID: PMC6480973.
34. Asz-Sigall D, Iñigo-Gomez K, Ortega-Springall MF, Vega-Memije ME, Arenas R, Tosti A. Alopecia Secondary to Hyaluronic Acid Embolization: Trichoscopic Findings. *Skin Appendage Disord.* 2019 Nov;5(6):396-400. doi: 10.1159/000502262. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31799272; PMCID: PMC6883453.
35. Ulusal BG. Platelet-rich plasma and hyaluronic acid - an efficient biostimulation method for face rejuvenation. *J Cosmet Dermatol.* 2017; 16(1):112-119. doi: 10.1111/jocd.12271. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27595866.
36. Pierre-Antoine Deglesne, Rodrigo Arroyo, Evgeniya Ranneva, Philippe Deprez. Estudio in vitro del producto de mesoterapia / biorevitalización inyectable RRS HA en fibroblastos de piel humana y su utilización clínica. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2016;9 41–53.
37. de Melo BAG, França CG, Dávila JL, Batista NA, Caliarí-Oliveira C, d'Ávila MA, Luzo ACM, Lana JFSD, Santana MHA. Hyaluronic acid and fibrin from L-PRP form semi-IPNs with tunable properties suitable for use in regenerative medicine. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020; 109:110547. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110547. Epub 2019 Dec 13. PMID: 32228935
38. Scarano A, Sbarbati A, Amore R, Iorio EL, Ferraro G, Marchetti M, Amuso D. The role of hyaluronic acid and amino acid against the aging of the human skin: A clinical and histological study. *J Cosmet Dermatol.* 2020 Oct 22. DOI: 10.1111/jocd.13811. Epub ahead of print. PMID: 33090687.
39. Ciccone V, Zazzetta M, Morbidelli L. Comparison of the Effect of Two Hyaluronic Acid Preparations on Fibroblast and Endothelial Cell Functions Related to Angiogenesis.

Velazco G. & Suárez D. Fibrina inyectable con ácido hialurónico como sistema de liberación intradérmica. Ensayo preclínico en modelo murino *Rev Venez Invest Odont IADR.* 2023;11(1): 5-41.

Cells. 2019 Nov 21;8(12):1479. DOI: 10.3390/cells8121479. PMID: 31766389; PMCID: PMC6952963.

40. De Angelis B, D'Autilio MFLM, Orlandi F, Pepe G, Garcovich S, Scioli MG, Orlandi A, Cervelli V, Gentile P. Wound Healing: In Vitro and In Vivo Evaluation of a Bio-Functionalized Scaffold Based on Hyaluronic Acid and Platelet-Rich Plasma in Chronic Ulcers. *J Clin Med*. 2019; 8(9):1486. doi: 10.3390/jcm8091486. PMID: 31540446; PMCID: PMC6780765

41. Afat İM, Akdoğan ET, Gönül O. Effects of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Alone and Combined With Hyaluronic Acid on Pain, Edema, and Trismus after Surgical Extraction of Impacted Mandibular Third Molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 May; 76(5):926-932. DOI: 10.1016/j.joms.2017.12.005. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29304325.

42. Martins Shimojo AA, Santos Duarte ADS, Santos Duarte Lana JF, Malheiros Luzo ÂC, Fernandes AR, Sanchez-Lopez E, Barbosa Souto E, Andrade Santana MH. Association of Platelet-Rich Plasma and Auto-Crosslinked Hyaluronic Acid Microparticles: Approach for Orthopedic Application. *Polymers (Basel)*. 2019; 11(10):1568. DOI: 10.3390/polym11101568. PMID: 31561615; PMCID: PMC6835642

43. Russo F, D'Este M, Vadalà G, Cattani C, Papalia R, Alini M, Denaro V. Platelet Rich Plasma and Hyaluronic Acid Blend for the Treatment of Osteoarthritis: Rheological and Biological Evaluation. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157048. DOI: 10.1371/journal.pone.0157048. PMID: 27310019; PMCID: PMC4911091.

44. Zhao J, Huang H, Liang G, Zeng LF, Yang W, Liu J. Effects and safety of the combination of platelet-rich plasma (PRP) and hyaluronic acid (HA) in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020; 21(1):224. DOI: 10.1186/s12891-020-03262-w. PMID: 32278352; PMCID: PMC7149899.

45. Iio K, Furukawa KI, Tsuda E, Yamamoto Y, Maeda S, Naraoka T, Kimura Y, Ishibashi Y. Hyaluronic acid induces the release of growth factors from platelet-rich plasma. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol*. 2016; 4:27-32. DOI: 10.1016/j.asmart.2016.01.001. PMID: 29264260; PMCID: PMC5730656.