



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Obtención de Rellenos Subdérmicos a partir de Ácido Hialurónico y Fibroblastos en Ratas Wistar

Doctor

Juan Raúl Castro Ayarza

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
División Especializada en Dermatología
Bogotá, Colombia

2012

Obtención de Rellenos Subdérmicos a partir de Ácido Hialurónico y Fibroblastos en Ratas Wistar

Doctor

Juan Raúl Castro Ayarza

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Dermatología

Director:

Docente Asociado, Médico Dermatólogo Universidad Nacional de Colombia
Héctor José Castellanos Lorduy

Codirectora:

Profesora Titular Departamento Ciencias Básicas Facultad de Odontología,
Investigadora Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia
Carmen Alicia Cardozo De Martínez

Línea de Investigación:

Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
División Especializada en Dermatología
Bogotá, Colombia

2012

Prologo

Cada año, al finalizar su periodo de formación como especialistas en el área médica, los aspirantes desarrollan un trabajo de grado, que quizás no tenga un impacto trascendental en el ámbito académico y científico, pero si tiene un valor agregado muy importante en la satisfacción personal de quien lo realiza.

Más allá del requisito, se vuelve un deseo, una necesidad y un objetivo en el cual cada estudiante de posgrado invertirá parte de su espacio, tiempo y conocimiento para finalmente entregar en un escrito los resultados de su esfuerzo. Es un logro y una alegría personal poder ejecutar y dar forma al mismo.

Es por eso que acá entrego entonces algo más que un estudio de evaluación con un enfoque determinado hacia el área de la especialización, entrego mis ideas y más allá de estas, de las personas que de alguna u otra forma participaron en su creación. Espero sea de su agrado.

Juan Raúl Castro Ayarza

Agradecimientos

Gina Alexandra Rodríguez – Microbióloga Instituto de Biotecnología

Producción de fibroblastos, conteo de fibroblastos y anestesia de los animales

Mauricio Martínez – Biólogo Instituto de Biotecnología

Conteo de fibroblastos

Jairo E. Marquez – Ingeniero de Sistemas

Análisis de Imágenes

Resumen

Objetivo: Obtener y evaluar un equivalente tisular a partir de fibroblastos autólogos de ratas Wistar combinado con ácido hialurónico para el desarrollo de un relleno subdérmico.

Materiales y Métodos: se obtienen y mantienen fibroblastos humanos *in vitro*, evaluando su cantidad por conteo en cámara de Neubauer. Se determina la viabilidad y capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos a diferentes concentraciones de ácido hialurónico *in vitro*, mediante evaluación fotográfica y análisis de imágenes. Se implantan rellenos subdérmicos compuestos de ácido hialurónico y fibroblastos, y se evalúa el comportamiento *in vivo* del material de relleno en el tejido celular subcutáneo de cuatro ratas Wistar, mediante estudio de histopatología.

Resultados: Los fibroblastos humanos se reproducen *in vitro* en un conteo de 400.000 fibroblastos en 48 horas. Los fibroblastos humanos se reproducen con concentraciones de ácido hialurónico al 2% y al 12%, después de la evaluación a 5 días. Las cuatro ratas Wistar toleran los rellenos subdérmicos de ácido hialurónico y fibroblastos, comparados con el control, sin presencia de efectos adversos

Conclusiones: Los rellenos subdérmicos de ácido hialurónico y fibroblastos, no afectan el comportamiento animal, ni presentan efectos adversos.

Palabras Clave: ácido hialurónico, fibroblastos, Ingeniería de tejidos, relleno facial, piel, envejecimiento.

Abstract

Title: Obtention of subdermic fillers from fibroblasts and hialuronic acid in Wistar rats.

Objetive: To obtain and evaluate a tissue equivalent combining autologous fibroblasts from Wistar rats and hialuronic acid for the development of facial filler in a pilot study.

Materials and Methods: Human fibroblasts were obtained and cultured in vitro, cell counts and viability were evaluated using Neubauer chamber and followed for five days. The reproduction rate of the human fibroblasts was determined at different concentrations of hialuronic acid in vitro, through photographic evaluation and images analysis. The subdermic fillers compounded of fibroblasts and hialuronic acid, were implanted in the subcutaneous cellular tissue of four Wistar rats. The in vivo was evaluated through histopathology.

Results: Human fibroblasts duplicated their cell count inside the boxes every 48 hours, at 2 % and 12 % hialuronic acid concentration. The Wistar rats used in this pilot study tolerated the intervention with the subdermic fillers of fibroblasts and hialuronic acid, without any adverse effects, when compared to controls.

Conclusions: The subdermic fillers of fibroblasts and hialuronic acid do not affect the cellular growth nor the scaring process in the animal model skin, neither showed adverse reaction in this pilot study.

Keywords: hialuronic acid, fibroblasts, tissue engineering, facial filler, skin, aging

Contenido

	Pág.
Resumen.....	V
Lista de gráfica.....	VIII
Introducción.....	1
Objetivos.....	6
1. Marco Teórico.....	8
2. Materiales y Métodos.....	16
2.1. Fase 1: Obtención de Fibroblastos y crecimiento in vitro en diferentes concentraciones de Ácido Hialurónico.....	16
2.2. Fase 2: Implantación en Ratas Wistar del material de ácido hialurónico y fibroblastos de Rata Wistar.....	20
3. Resultados.....	23
3.1. Fase 1: Obtención de Fibroblastos y crecimiento in vitro en diferentes concentraciones de Ácido Hialurónico.....	23
3.2. Fase 2: Implantación en Ratas Wistar del material de ácido hialurónico y fibroblastos de Rata Wistar.....	28
4. Discusión.....	32
5. Conclusiones.....	38
6. Bibliografía.....	39

Lista de gráficas

Gráfica 1-1: Presencia en la cara de los volúmenes que se modifican con el envejecimiento.....	9
Gráfica 2-1: Inyección del material de relleno y fibroblastos.....	21
Gráfica 3-1: Conteo en cámara de Neubauer.....	23
Gráfica 3-2: Fotografías comparativas de los pozos de cultivo.....	24
Gráfica 3-3: Análisis de imágenes de pozos de cultivo	26
Gráfica 3-4: Inyección del material de relleno en la zona cervical de los animales.....	28
Gráfica 3-5: Toma de las muestras de los animales de 1 a 5.....	29
Gráfica 3-6: Placas de histopatología de la zona cervical tomada en biopsia del animal 1.....	31
Gráfica 3-7: Placas de histopatología de la zona cervical tomada en biopsia del animal 2.....	31

Introducción

El envejecimiento era visto en las culturas antiguas como un reflejo de sabiduría, por el contrario, en la era moderna con el afianzamiento del pensamiento de la cultura occidental, el hecho de envejecer ha tenido cambios en su conceptualización y en el imaginario social, bajo una mirada en la que se le relaciona con el deterioro físico o la incapacidad, razón por la cual hay un deseo de postergar el proceso o por lo menos en la atenuar sus manifestaciones, entre ellas las relacionadas con los cambios en la piel. Teniendo en cuenta lo anterior, surge la importancia de analizar por qué la medicina ofrece y busca nuevas alternativas para disminuir los signos de este proceso fisiológico. (1)

Aunque el envejecimiento es un proceso simultáneo en todos los órganos, en la piel este proceso se hace más notorio y su apariencia principalmente en el rostro es, al parecer, la que mayor importancia tiene en el comportamiento social. (2) La piel constituye para muchos el mayor órgano social en la interacción humana puesto que, es a través de ella que se percibe, se siente y se aprecian a las otras personas. La función de la piel como creadora de identidad personal o colectiva ha tenido gran importancia en todas las culturas, vincula los adelantos de la medicina con sus implicaciones y trasegar social.

El interés de la piel como órgano autónomo es en realidad bastante reciente. “Los primeros libros de dermatología aparecieron en el siglo XVIII y, más que estudiar la piel en sí, surgieron para explicar las marcas de nacimiento”. Con ellos empezó la teoría hoy popular de que las manchas al nacer eran el resultado de los sustos o antojos de la madre durante el embarazo. La importancia que tuvo, fue en torno a las marcas cicatriciales que se generaban de otras enfermedades. (3)

La Dermatología Estética precisamente se formula para dar respuesta a éstos retos por lo que abre un gran campo de investigación que adicionalmente ha constituido una importante fuente de recursos, ante la demanda por los pacientes que desean atenuar los signos del envejecimiento. (4,1)

El proceso de envejecimiento a nivel facial, ocurre por cambios en la estructura de la piel que afectan la epidermis, la dermis, el tejido celular subcutáneo, la estructura ósea, la musculatura y las conducciones nerviosas que se van deteriorando, además de otras entidades patológicas que pueden aumentar la apariencia de vejez. (5)

Se puede definir el envejecimiento como una pérdida progresiva de la capacidad homeostática del organismo, manifestada en una reducción de sus funciones y un aumento de la vulnerabilidad a las enfermedades. (5)

Existen diversas teorías que tratan de explicar las causas del envejecimiento, entre ellas, el envejecimiento cronológico y el envejecimiento inducido; dentro de este último participan elementos como el sol y diferentes tipos de radiaciones, lo que se conoce como fotoenvejecimiento y otros como los radicales libres. (6) Estos generan en la piel cambios estructurales tales como la disminución del colágeno que se presenta con las arrugas, la pérdida de la regeneración celular y la aparición de cambios pigmentarios. (7)

Es por esto que la industria farmacéutica ha generado varios productos para tratar en cada uno de los elementos de la piel que se van deteriorando, para mejorar su función. Es así como se utiliza la aplicación de toxinas que afectan la placa neuromotora (Botox, Dysport) para disminuir las rítmicas de movimiento, (8) también la inyección a nivel subdérmico de materiales que aumentan el volumen perdido por la dermis y el tejido celular subcutáneo (ácido hialurónico, colágeno), (9) se utiliza energía en tratamientos de laser o en la luz pulsada intensa, para mejorar el aspecto de la epidermis y renovar elementos propios de la dermis. (10) La terapia fotodinámica, mecanismos moleculares con análogos retinoides que tiene acciones antiproliferativas ante los cambios de

celulares que empeoran la apariencia de la piel, no solo desde un punto de vista médico sino estético. (11,12)

El uso de los rellenos subdérmicos se remonta tres décadas atrás con la búsqueda de materiales que pudieran reemplazar la estructura anatómica de la piel, y dado que el elemento principal de la dermis es el colágeno, fue esta proteína [aislada por primera vez en 1957] la primera candidata en la nueva metodología. Sin embargo no fue sino hasta la década de los setenta, cuando se utilizó con el fin de manejar ríides de forma estética. (9)

La producción en gran escala del colágeno utilizó en sus orígenes fuentes bovinas que progresivamente cayeron en desuso por las posibles reacciones adversas y el rechazo potencial entre especies. Luego se usó colágeno de origen humano proveniente de donantes cadavéricos, que tenía como principal problema el riesgo biológico, a pesar de encontrarse bajo todas las condiciones de esterilidad. Se empezó a utilizar entonces, colágeno de origen autólogo; es decir, del mismo paciente. El método consistía en tomar una muestra de piel, la cual requería un proceso de 6 a 8 semanas de cultivo y un área de piel donante muy extensa, por lo que se hacía un procedimiento poco práctico y de difícil aplicación en el ámbito clínico, debido a la dificultad técnica y el tiempo necesario. A pesar de los esfuerzos para superar estos inconvenientes, como pruebas de alergia para evitar reacciones adversas y la estandarización de técnicas para su obtención y aplicación, el uso de colágeno como material de relleno se discontinuó debido la aparición de otros materiales con mejor perfil de bioseguridad tales como el ácido hialurónico, el ácido poli-l-láctico, polimetacrilatos o la hidroxilapatita de Calcio. (9)

El ácido hialurónico, fue aislado en 1934 del humor vítreo de una vaca, (13) y es ahora en la dermatología cosmética uno de los rellenos subdérmicos más utilizados, debido a su efecto inmediato de volumen al momento de su aplicación y un perfil alto de bioseguridad con muy pocos efectos adversos reportados. Es el más utilizado en el momento, con cerca de 750.000 pacientes tratadas cada año en Estados Unidos. (14) Desafortunadamente sus costos son elevados y su efectos es temporal que puede oscilar

entre 6 meses a un año, (13) por lo cual aún se buscan alternativas que permitan mejorar sus características y disminuir su efecto deletéreo.

En la última década se ha intentado además del uso de materiales de rellenos, la introducción de células como partes de los injertos, para contrarrestar los signos del envejecimiento, por lo cual se han evaluado células propias de la dermis. (13)

La ingeniería de tejidos es una rama de la bioingeniería que tiene el objetivo de desarrollar condiciones de cultivo para generar líneas celulares con la capacidad de mimetizar las funciones biológicas, hacia 1975 se iniciaron los experimentos en piel con la producción de cultivos epidérmicos que se trataron de trasplantar en pacientes con quemaduras. (15) Dichos cultivos utilizaron como sustrato celular a los fibroblastos, cuya expansión *in vitro* es menos dispendiosa en comparación a otras líneas celulares como la de los queratinocitos, por lo que posteriormente se consideró el uso de fibroblastos como sustituto celular no sólo a nivel epidérmico sino en la regeneración de la dermis. (16,17)

Es por esto que surge la idea de generar un relleno subdérmico, que no sólo tenga un componente de relleno físico como es el ácido hialurónico, sino que asociado a un componente celular como los fibroblastos, puede mejorar su perfil, aumentando los efectos y el tiempo del relleno. (18) Esta combinación se encuentra aún en fase experimental, por lo que no ha sido probada en seres humanos.

Antes de poder aplicar rellenos subdérmicos de ácido hialurónico asociados a fibroblastos en los seres humanos para evaluar su efectividad clínica, se debe pasar por un proceso de experimentación *in vitro* donde se realice la expansión de los fibroblastos, y se evalúe su asociación al ácido hialurónico. Una vez se obtenga un perfil de seguridad adecuado en dichos cultivos, se continúa con la fase de experimentación en modelos animales teniendo en cuenta los protocolos de experimentación con animales. (18)

El resultado de la fase de experimentación en modelos animales sobre la evaluación de fibroblastos combinados con ácido hialurónico, podría permitir en un futuro el inicio de la utilización de esta técnica para el desarrollo de un relleno subdérmico que pueda ser implementado en seres humanos, evaluando así su bioseguridad y la calidad de los resultados clínicos.

La importancia del presente trabajo radica en ser la fase inicial de un proyecto que permitirá el desarrollo pionero de rellenos subdérmicos con compuestos celulares en nuestro país.

Objetivos

Objetivo Principal

Obtener y evaluar un equivalente tisular a partir de fibroblastos autólogos de ratas Wistar combinado con ácido hialurónico para el desarrollo de un relleno subdérmico.

Objetivos Específicos

1. Obtener y mantener fibroblastos humanos en medio de cultivo.
2. Determinar la viabilidad y capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos a diferentes concentraciones de ácido hialurónico *in vitro*.
3. Formular una técnica para la implantación del compuesto de ácido hialurónico y fibroblastos, que permita su inyección subdérmica.
4. Evaluar el comportamiento *in vivo* del material de relleno en el tejido celular subcutáneo de las ratas Wistar.

5. Generar protocolos para iniciar trabajos en seres humanos que permita implementar la misma técnica utilizada en el cultivo de fibroblastos y ácido hialurónico para generar rellenos subdérmicos.

1. Marco Referencial

La sociedad moderna ha convertido el aspecto estético en uno de los pilares fundamentales para lograr la aceptación social. Esto ha sido ampliamente utilizado por la industria a distintos niveles, para lo cual se ha destinado una inversión de recursos científicos y económicos para ofrecer nuevos productos que puedan cubrir la creciente demanda en el tratamiento para atenuación de los signos del envejecimiento, buscando reemplazar los elementos de la piel que se van perdiendo con el tiempo. (13,19,20)

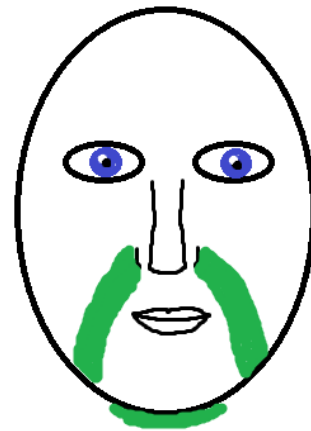
El proceso de envejecimiento a nivel celular se traduce en la pérdida de la capacidad proliferativa de los diferentes tipos de células [melanocitos, queratinocitos, fibroblastos] que conforman los tejidos y en la disminución de la capacidad de respuesta ante los mecanismos de señalización celular como los factores de crecimiento, lo cual conlleva no solamente a una menor densidad celular sino a una matriz extracelular de baja calidad. (1)

Los fibroblastos son las células encargadas de la producción de los elementos de la matriz extracelular tales como el colágeno, la elastina, el ácido hialurónico, entre otras; con el proceso de envejecimiento, las células pierden su función y la capacidad de mantenimiento de los elementos de la matriz extracelular por lo que las propiedades elásticas y de sostén de la piel se pierden. (1,21)

Sin embargo, el proceso de envejecimiento no sólo produce cambios en la piel, sino que está asociado además, una pérdida de volumen del tejido óseo, aumento de la tensión tejido muscular, aparición de atrofia e hipotrofia en ciertas zonas del tejido celular subcutáneo, adelgazamiento de la dermis y de la epidermis, cambios pigmentarios y vasculares, que viene a generar el aspecto de vejez. Gráfica 1.



a. zonas de Atrofia



b. zonas de hipertrofia

GRÁFICA 1-1. Presencia en la cara de los volúmenes que se modifican con el envejecimiento. (Realizado Dr. Juan Raúl Castro-Ayarza)

Como se mencionó anteriormente, se han desarrollado diferentes opciones para el tratamiento del envejecimiento de la piel, como la aplicación de neurotoxinas que afectan la placa neuromotora (Botox, Dysport) disminuyendo los efectos de la tensión muscular prolongada en la apariencia del envejecimiento, (8) la aplicación de rellenos subdérmicos con base en diferentes tipos de materiales como colágeno, ácido hialurónico, polimetacrilatos, cristales de calcio y otros materiales, con el objetivo de reemplazar el volumen perdido en las zonas de atrofia, (9,19) el uso de energía para generar modificación de los cambios del grosor de la epidermis y dermis, frente a los cambios pigmentarios o vasculares mediante tratamientos de Laser, luz pulsada intensa o terapia fotodinámica. Otras opciones como fármacos que actúan a través de mecanismos moleculares tipo análogos retinoides, favoreciendo la regeneración y en recambio de los elementos de la epidermis y de la dermis perdidos con el tiempo. (11,12)

Sin embargo, estos tratamientos resultan ser insuficientes, requieren múltiples sesiones, o exigen una administración permanente del tratamiento debido que la piel retoma las características del daño acumulado, con pérdida del volumen, reaparición de las rítdes y surcos. (22)

La medicina no ha sido indiferente a este cambio y sus nuevos objetivos están encaminados hacia el desarrollo de procedimientos que garanticen devolver las condiciones perdidas a los elementos estructurales de la piel. Dentro de los procedimientos reportados y publicitados en los medios de comunicación (incluyendo internet) están: el uso tópico de colágeno xenogénico y la inserción de colágeno mediante procedimientos quirúrgicos, inyección de plasma sanguíneo, aplicación de plasma sanguíneo autólogo, inserción mediante cirugía de productos re-absorbibles como ácido poliláctico, el copolímero ácido poli-glicólico-poliláctico, ácido hialurónico, entre otros la inyección de toxina colérica para el estiramiento de los músculos, inyección de hormonas. (23) De manera general se puede afirmar que todos estos procedimientos se usan diariamente en los tratamientos faciales en Colombia y en el mundo.

Para mejorar el desarrollo de los rellenos subdérmicos como sustitutos tisulares, es importante entender la fisiología del tejido al cual va estar dirigido. La inflamación es un proceso inevitable ante la presencia de cualquier elemento ajeno al tejido pero el objetivo es que los materiales utilizados sean biocompatibles y que el proceso inflamatorio no sea inmediato y en lo posible de baja intensidad, con el objetivo de prolongar la vida media del relleno, y entender a su vez cómo es este proceso después de inyectado el relleno subdérmico. (24)

La aparición de los neutrófilos actúan inicialmente en la respuesta inflamatoria innata ante la aparición de cuerpo extraño, sin embargo, como su vida no es prolongada, usualmente ante cuerpos extraños de difícil degradación el macrófago adopta una dominancia en este proceso, en el proceso de reconocimiento del mismo. (25) Se asume un mecanismo de fagocitosis compuesto por tres pasos: el primer paso es el reconocimiento y unión al elemento extraño, mediado por liberación de opsoninas con complemento C3b y la por FE del la Inmunoglobulina G. Es segundo paso de inmersión, vacuoliza la partícula mediante la prolongación de pseudópodos. Y un tercer paso de muerte y degradación con la aparición de lisozimas, colagenasas y hialuronidasas y oxidación con iones superóxido y producción de peróxido de hidrógeno, con el fin de producir el procesamiento final del relleno. (25)

No se comprende bien el proceso que suscita la fagocitosis, pero es claro que a medida que el tamaño de la partícula es mayor, la fagocitosis es más difícil. En los humanos es raro que un macrófago pueda hacerlo con partículas mayores de 5µm, que usualmente requieren la aparición de agregaciones en células gigantes. (25,26)

No sólo el tamaño de la partícula tiene que ver con el proceso de la fagocitosis sino un elemento al cual no se le ha prestado la suficiente atención: la forma del elemento a fagocitar, ya que se ha reportado que las formas esféricas parecen ser resistentes al reconocimiento por los macrófagos. Entre tanto, la carga de la partícula no ha demostrado ser determinante y la capacidad hidrofílica de una partícula indicaba ser más resistente a la fagocitosis; sin embargo, un mecanismo contrario mediante la adherencia de anticuerpos parece contrarrestar esta característica hidrofílica resistente para transformarla en hidrofóbica y susceptible de ser fagocitada. (13) La forma, tamaño de la partícula, la capacidad de asociación o la termoestabilidad puede determinar la viabilidad del producto. (25)

Cuando los macrófagos no son capaces de fagocitar se produce la formación de granulomas, esto es, la asociación de múltiples macrófagos que intentan aislar los elementos extraños al tejido y los cuales no ha podido eliminar. Durante la formación de un granuloma, los macrófagos cambian su morfología y adoptan una similar a las células epiteliales, por lo que se les conoce como células epitelioides. (26) Es clave reconocer que los granulomas pueden tener elementos adicionales como la presencia de una capa de recubrimiento de fibroblastos, que al parecer evitan la reactivación del proceso inflamatorio; sin embargo, en muchas ocasiones, ante elementos desencadenantes desconocidos se reactiva la cascada inflamatoria. (25)

Es importante reconocer las interacciones entre el producto implantado y el tejido huésped. Una forma de hacerlo es observar la neo colagenogénesis, proceso que es favorecido por aditivos tales como el ácido hialurónico, la hidroxiapatita de calcio, el ácido poli L – láctico y el polimetilmetacrilato, según ha sido reportado. (27)

Las reacciones de inmunogenicidad siempre se han cuestionado, debido a la elevación de las inmunoglobulinas que ocurre en las pruebas que se han realizado para la aplicación de elementos extraños e incluso autólogos, desde las primeras pruebas que se hicieron para la producción de agentes hemostáticos que mostraban esta situación. La aparición de reactividad cutánea, en razón de la inyección de un material extraño, era independiente de esa aparición de anticuerpos, e incluso se asoció a la aparición de dermatomiositis, como una enfermedad de una característica propiamente autoinmune. Se han evaluado reacciones granulomatosas y posibles reacciones inflamatorias secundarias a la presencia de biofilms que puedan exacerbarlo, sin embargo en este momento no es claro que elementos pueden ser los desencadenantes de estas reacciones de inmunogenicidad. (23) Con el uso de diferentes rellenos subdérmicos existentes en el mercado, las complicaciones más frecuentes que se pueden observar en todos los implantes subdérmicos son eritema, enrojecimiento, edema, formación de nódulos, dolor, necrosis, infección, formación de nódulos, granulomas, cicatrización. (23)

Entonces comprender el comportamiento de los diferentes materiales para la realización de rellenos subdérmicos, conociendo las características estructurales y moleculares, con respecto a las reacciones inmunes que podrían presentar, permite entender su utilidad y posibilidad de utilización. (25)

Uno de los materiales de relleno subdérmico más utilizados, es el ácido hialurónico, una molécula aislada en 1934 del humor vítreo de una vaca, (13) y corresponde al 0.02% del peso corporal total en el ser humano. Producido por los fibroblastos en fragmentos de un peso molecular de 20KDa, es un glicosaminoglicano que se encuentra naturalmente en la dermis, puede asociarse a los fibroblastos e inducir en ellos la síntesis de fibras de colágeno, componente esencial de la matriz extracelular que circunda el tejido y que permita mantener el efecto de volumen. (14,25) El ácido hialurónico se deposita en diferentes tejidos mesodérmicos, con mayor importancia a nivel dérmico y articular; de esta manera, se han desarrollado métodos clínicos en zonas articulares y de piel mediante la aplicación de rellenos subdérmicos; métodos con 25 años de historia, pero que han tenido su advenimiento en la última década. (13)

La hidroxiapatita es otro material utilizado en el desarrollo de rellenos subdérmicos, en ellos, se utilizan partículas de tamaños que oscilan entre los 20 y los 45 micrómetros, ya que partículas por debajo de los 15 micrómetros se degradan. La hidroxiapatita tiene propiedades físicas tales como la viscosidad y un alto número de enlaces cruzados que favorecen el aumento del volumen como material de relleno. (28)

A pesar de las diversas fuentes de colágeno [animal, homólogo, autólogo], los rellenos subdérmicos basados en este material han venido cayendo en desuso por su elevada inmunogenicidad, situación que aumentaba los costos de los tratamientos en pro de disminuir los efectos adversos y los protocolos por mejorar la seguridad biológica de los materiales. (9)

Otro material utilizado ha sido el ácido poliláctico, empleado desde hace 30 años aproximadamente en los tratamientos de rejuvenecimiento facial dadas sus características de mantener efecto prolongados hasta por 3 años; sin embargo, existe el riesgo de desarrollar granulomas o pápulas subcutáneas, lo que lo hace poco popular ante el advenimiento de mejores tecnologías. (27) El mismo riesgo de favorecer la formación de granulomas se discute con el uso de polimetil-metacrilato (PMMA) y siliconas (Polimetilsiloxano), situación bastante difícil de predecir y tratar. (23,29)

La necesidad de generar un tratamiento que mantenga los resultados por mayor tiempo ha traído la idea de generar nuevos sustitutos donde las reacciones adversas sean menores, por lo que los trasplantes de tipo autólogo son una mejor opción. (13,30)

Con base en esta hipótesis, se generó la idea de inyectar fibroblastos autólogos, los cuales favorecerían la producción de colágeno, la integración al tejido circundante y la estabilidad de las características de la matriz extracelular y la recuperación del volumen del tejido. (29)

Los primeros experimentos con fibroblastos humanos, se realizaron en Washington en 1998, donde un grupo de investigadores evaluó el uso de fibroblastos humanos autólogos, los cuales se utilizaron en un implante previamente producido a partir de colágeno, con resultados que no fueron corroborados con histopatología y sin encontrar clara diferencia clínica. (30) El uso de fibroblastos como elemento único del relleno subdérmico se evaluó en defectos como depresiones y ríttides con resultados cosméticos aceptables. En estos estudios se hicieron análisis histológicos, los cuales demostraron un aumento de la densidad celular en aquellos lugares donde se habían inyectado los fibroblastos; (32) por otro lado, se ha demostrado mediante marcadores citométricos la persistencia de los fibroblastos en el lugar del trasplante. (33)

En el año 2007 Weiss y colaboradores publicaron un estudio que incluía 151 pacientes tratados con el implante de fibroblastos versus placebo en zonas de depresiones y cicatrices, consiguiendo una mejoría estética significativa con el implante celular. (34)

El trasplante autólogo de fibroblastos carece de la capacidad de generar cambios estructurales inmediatos en el tejido huésped, surge como alternativa innovadora, la asociación en un mismo constructo de los elementos celulares y aditivos como el ácido hialurónico. (35) Al parecer, el ácido hialurónico podría favorecer la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos y ayudar a mantener el efecto de volumen requerido en las zonas de defecto por más tiempo.

Dado que lo que se pretende evaluar es una nueva técnica de tratamiento médico, antes de poder ser implementada en los seres humanos, debe garantizarse la seguridad del procedimiento, por lo que es necesario seguir un protocolo de investigación aprobado por un comité de ética que permita la evaluación *in vitro* en primera instancia del comportamiento de las células que se pretenden trasplantar. (36)

Estudios previos en modelos animales evalúan injertos de colágeno asociados a ácido hialurónico en heridas en dorso de ratas con el objetivo de mejorar el proceso de

cicatrización, con resultados que muestran interés en la aceleración del proceso. (35) También se ha evaluado en ratones el uso fibroblastos humanos y placenta con evaluación histológica, mostrando resultados promisorios del uso de las células con evaluación histológica. (37) Esto permite evaluar el uso de células como los fibroblastos en la reposición de elementos perdido o dañados en la piel. Solakoglu y colaboradores, no reportaron ningún tipo de complicaciones en el manejo de rellenos subdérmicos de fibroblastos asociados a ácido hialurónico implantados en ratas. (35)

La búsqueda de nuevos materiales y técnicas de rellenos subdérmicos, tiene como objetivo aumentar la duración de los efectos en el paciente una vez sea utilizado, debido a que actualmente las opciones terapéuticas que existen oscilan en una permanencia de los efectos entre 6 meses a un año. (21) A este objetivo se dedicara la viabilidad del material que se obtenga para el relleno subcutáneo, aumentando la vida media del material una vez sea implantado.

2. Materiales y Métodos

2.1. Fase 1: Obtención de Fibroblastos y crecimiento in vitro en diferentes concentraciones de Ácido Hialurónico

Los fibroblastos fueron aislados a partir de una muestra humana proveniente de la donación del tejido dérmico de una persona sistémicamente sana, sin patologías sistémicas ni patología cutánea, bajo consentimiento informado del paciente donador. Esta se obtiene bajo anestesia local en la institución médica correspondiente.

El tejido se transporta en un tubo que contiene con medio de cultivo DMEM, suplementado con suero Fetal Bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomycin y 0,25 ug/ml de anfotericina B. Es llevado en las primeras 6 horas posteriores a la toma de la muestra para el laboratorio donde es procesado.

Una vez en el área de cultivos celulares del laboratorio de Biomiméticos de la Universidad Nacional de Colombia en la cabina de flujo laminar se retira el tubo y se pasa el tejido transportado a una caja de Petri para realizar lavado en una solución de Hanks suplementada con antibiótico y antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomycin, 0,25 ug/ml de anfotericina B). Este procedimiento se realiza 3 veces.

Se retira el tejido celular subcutáneo y se secciona el tejido para el cultivo en pequeños pedazos de 1mm, los cuales serán cultivados como explantes. Estos fragmentos de piel se siembran sobre placas de seis pozos de 25mm² y se cubren con 2 ml medio de

cultivo (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y solución de antibiótico antimicótico al 1 %

Los cultivos son mantenidos hasta obtener el número de células suficientes para el ensayo, se obtienen dos frascos T 25 pase 1 confluentes. Se someten a disgregación celular con Tripsina EDTA al 0.5% durante aproximadamente 5 minutos la acción de la enzima se inactiva con medio suplementado con suero. Esta solución se lleva a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos. Una vez se obtiene un precipitado de células se resuspenden en 1ml de medio de cultivo se hace conteo en cámara de Neubauer y los cálculos para sembrar 400.000 células por pozo en placa de 6 pozos.

Las células son sembradas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % y solución de antibióticos al 1 % a este medio se le adiciona ácido hialurónico (Teosyal^{MR}) en concentración final del 12 % y 2 % respectivamente. Como control se siembra el mismo número de células en el medio de cultivo sin ácido hialurónico. La viabilidad celular será evaluada mediante la evaluación visual con ayuda de fotografías que se analizarán con ayuda del software analizador de imágenes y, mediante tinción con colorante vital azul de tripán a las 48 horas de cultivo. Los pozos quedaron distribuidos de la siguiente manera:

-Pozo 1 y 2 Medio de cultivo más ácido hialurónico en gel al 2 %.

-Pozo 3 y 4 Medio de cultivo más ácido hialurónico en gel al 12 %.

-Pozo 5 y 6 Medio de cultivo fibroblastos

Las placas de cultivo fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de CO² al 5 % durante 48 horas.

Una vez completadas las 48 se retira la placa de cultivo y se observa cada uno de los pozos, se toman imágenes fotográficas de los cultivos esto se hace mediante la observación del pozo a través del microscopio de luz invertida, donde el observador determina de forma cualitativa la cantidad de fibroblastos que cubren la superficie. Una vez terminada la fase de observación se procede a hacer el ensayo de viabilidad para este las células fueron lavadas disociadas con tripsina EDTA y resuspendidas en medio DMEM suplementado. Se toman 10 microlitros de esta solución y se mezclan con 10 microlitros de tripán azul para hacer una dilución de células en volúmenes iguales. Se sirve la dilución células/colorante en la cámara de Neubauer, para la observación al microscopio de luz invertida, bajo el objetivo de 10x, se enfoca el cuadrante central de la cámara y se cuentan las células que no tomaron coloración azul observadas en los 4 cuadrantes externos. Estas células se consideran como vivas y se observan de morfología redonda y refringente por el contrario las células consideradas como muertas son las que incorporan el colorante tripán azul debido a que su membrana se ha hecho permeable y se observan teñidas de azul.

Se promedia el resultado de los cuatro cuadrantes el resultado se multiplica por dos que fue la dilución entre tripan y la solución celular este valor a su vez se multiplica por 10.000, que es un valor constante y corresponde al volumen y número de cuadrantes dado por la cámara de Neubauer. El valor obtenido corresponde al número de células vivas por mililitro.

Los resultados del análisis gráfico obtenido a partir de las fotografías se realizan con el programa Matlab 2011b. Las imágenes dadas se transforman a escalas de grises y se aplica una máscara de negativo. Luego se aplican algoritmos de procesamiento de imágenes como la segmentación, umbralización y filtrado, con miras a reducir el grado de ruido (imperfecciones asociadas e inherentes a cada fotografía y a problemas de enfoque y nitidez entre otros factores) y efectuar el conteo de células.

Para la detección de los bordes de las células debido a su estructura geométrica, se determinan las regiones con los objetos (células) a estudiar, considerando los bordes y el

umbral fijo. Se prueban los algoritmos de Canny y de Sobel, con el fin de determinar cuál de ellos era el más apropiado para el análisis según la calidad de las imágenes a estudiar. De acuerdo a este se determina los falsos positivos registrados, como elementos adicionales que se encuentran en las muestras juntos con las células, debido a la resolución de las imágenes en la parte del procesamiento.

Los falsos negativos registrados son células se encuentran agrupadas en las imágenes, que el programa detecta como una sola célula dichos grupos. Para minimizar estos errores, se toma como referente el tamaño estándar de las células, se reduce hasta un mínimo el ruido, y con ello poder obtener una data con un grado de error aceptable.

2.2. Fase 2: Implantación en Ratas Wistar del material de ácido hialurónico y fibroblastos de Rata Wistar.

Para obtener los fibroblastos de rata se toma una biopsia cutánea de Rata Wistar, y se siembra de acuerdo a los protocolos para cultivo de células adoptados por el descrito en la fase 1, de este documento.

Para la implantación del relleno se utilizaron cuatro Hembras de Rata Wistar SPF de 250 gramos de peso promedio, como agente anestésico se utilizo Isoflurano, se realizó inducción en cámara anestésica al 4% y mantenimiento en anestesia general al 2% una vez verificada la profundidad anestésica. Se realiza afeitado de la piel de la zona cervical posterior y se procede a realizar marcación del área receptora y fotografía previa a la aplicación del relleno, se limpió la zona con solución de yodopovidona.

Se inyecta subdérmico ácido hialurónico (Teosyal MR) en concentración 15mg/ml, produciendo una masa en la zona cervical de cuatro animales en diferentes volúmenes. La aplicación de las células se hará en 3 líneas imaginarias que atraviesen la zona receptora previamente inyectada por ácido hialurónico.

Se realizo la inyección del relleno subdérmico en 4 animales, en la zona cervical donde se aplicó a diferentes volúmenes y concentraciones el ácido hialurónico y posteriormente se le inyectó el número de células determinado por el conteo. Se hace control fotográfico y delineación de la masa que se provoca por la inyección del material en el animal.

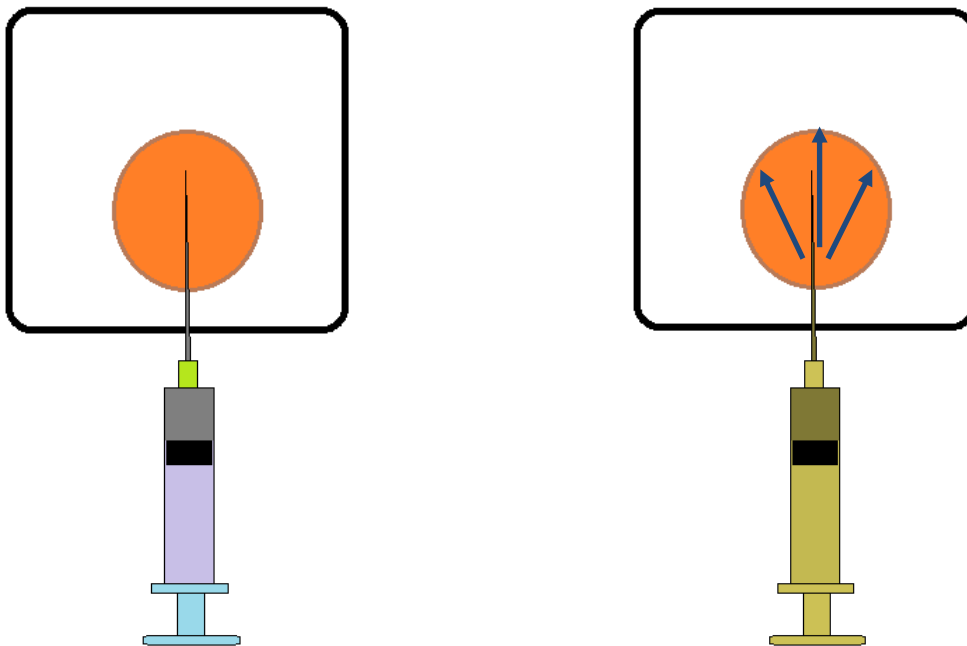
Los animales se identificaron marcando un número en la cola con marcador indeleble y se distribuyeron en el ensayo de la siguiente manera

ANIMAL 1. Aplicación de ácido hialurónico 15mg/ml hasta completar 0.8cc.

ANIMAL 2. Aplicación de ácido hialurónico 15mg/ml hasta completar 0.8cc + 1 millón de fibroblastos en 0.4cc de solución salina.

ANIMAL 3. Aplicación de ácido hialurónico 15mg/ml hasta completar 0.8cc + 2 millones de fibroblastos en 0.8cc de solución salina.

ANIMAL 4. Aplicación de 2 millones de fibroblastos en 0.8cc de solución salina, sin ácido hialurónico.



1a. Aplicación del ácido hialurónico
relleno

1b. Inyección de los fibroblastos en el

GRAFICA 2.1. Inyección del material de relleno y fibroblastos.

Se realiza fotografía de la zona receptora de la rata en zona cervical, posterior a la aplicación del relleno subdérmico de ácido hialurónico y medición del volumen inyectado.

Una vez terminada la intervención se espera a la recuperación anestésica de los animales se les suministro agua y alimento ad libitum y se ubicaron en cajas individuales con una manta térmica debajo de cada caja, previo al inicio del ensayo y bajo anestesia general se les administro meloxicin[®] como agente analgésico de acción prolongada. Los animales fueron observados y mantenidos de acuerdo a los procedimientos establecidos dentro del programa de cuidado veterinario de la sala de animales del laboratorio de Biomiméticos de la Universidad Nacional de Colombia que se acoge a las guías establecidas en por el consejo Canadiense de protección de los animales en el manual sobre el uso y cuidado de los animales de experimentación

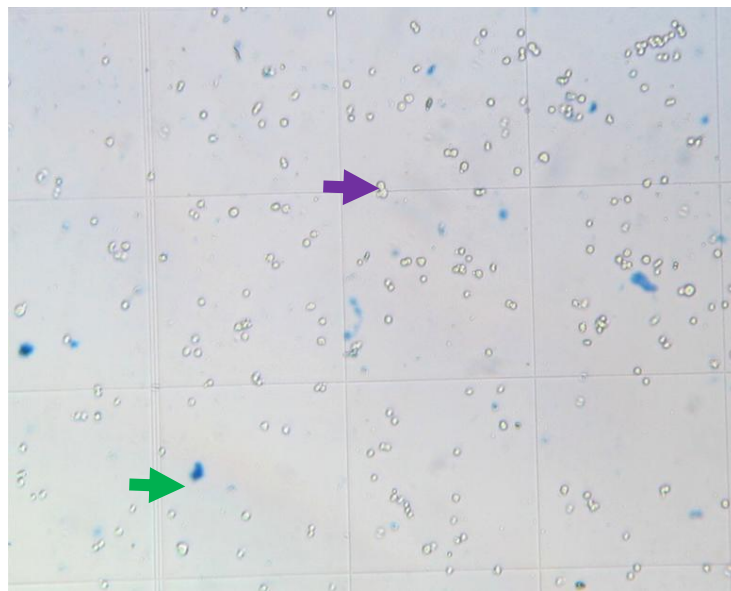
Después de 10 semanas de realizado colocado el relleno se procede a la toma de las biopsias. Los animales fueron sacrificados de debido a que cumplían su ciclo vital en la sala de animales. Se realizó sacrificio de cada Rata en cámara de CO₂. Se procede a realizar afeitado de la zona cervical donde previamente se realizó el implante y se toman fotografías de la zona. Se toma biopsia de la zona cervical y se envía en formaldehído al 15% para estudio de Histopatología.

En conjunto con dos patólogos se procede a describir la histopatología de cada una de las muestras, el proceso de adaptación de los fibroblastos y el ácido hialurónico a tejidos homólogos. Los patólogos son externos al proyecto de investigación y desconocen las concentraciones en que se inyectó el relleno

3. Resultados

3.1. Fase 1: Obtención de Fibroblastos y crecimiento *in vitro* en diferentes concentraciones de Ácido Hialurónico

Se realizó el cultivo de fibroblastos humanos en T25 [hay que mencionar la casa comercial] los cuales permiten un crecimiento de hasta 5×10^6 células. Se verificó la viabilidad celular mediante el conteo en cámara de Neubauer.



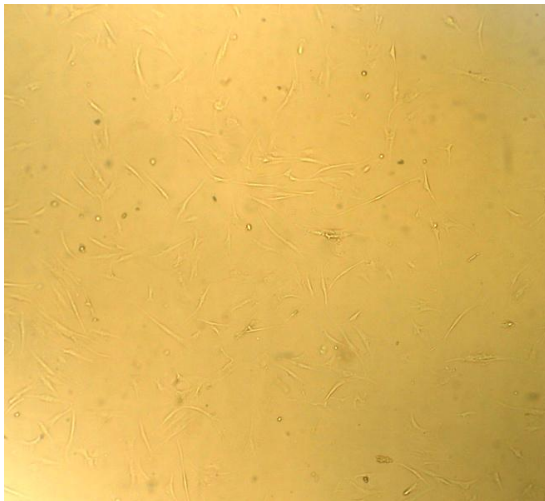
GRÁFICA 3.1. Conteo en cámara de Neubauer. Se observa en azul las células no viables (flecha verde) y como pequeños círculos transparentes, las células viables en el cultivo (flecha violeta).

Se encontró una confluencia similar en todos los pozos examinados, con una duplicación de densidad celular respecto a la inicial. Se registra estos datos al día 5 de cultivo y se realiza nuevo cultivo de fibroblastos a partir de fibroblastos humanos con dos pases.

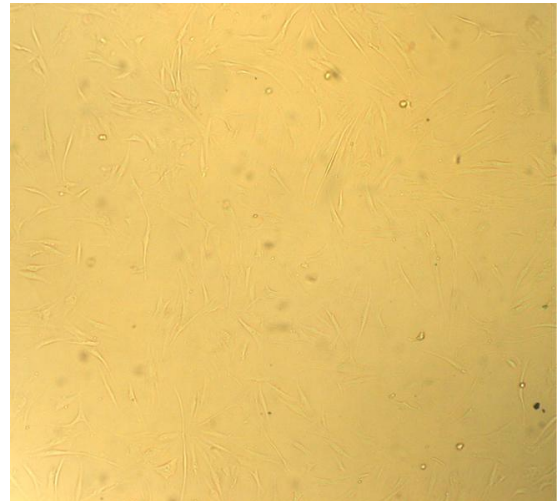
-Pozo 1 y 2 [Medio de cultivo con ácido hialurónico en gel al 2%:] confluencia celular del 70% se observa adherencia celular y morfología característica de fibroblasto. En la superficie se observa poco cantidad de células muertas.

-Pozo 3 y 4 [Medio de cultivo con ácido hialurónico en gel al 12%:] se observa una confluencia celular del 60% de células adheridas a la superficie de cultivo con morfología de fibroblasto. Se observa una población de células no adheridas a la placa en mayor cantidad, principalmente en el pozo 3, asumiendo estas células como muertas.

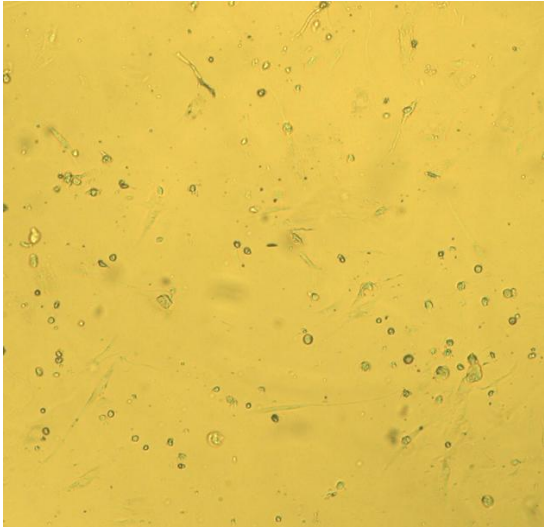
-Pozo 5 y 6 [Medio de cultivo con fibroblastos se observa una confluencia celular del 80 % de células adheridas en la superficie de cultivo. Se observa una menor cantidad de células no adheridas a la placa de cultivo.



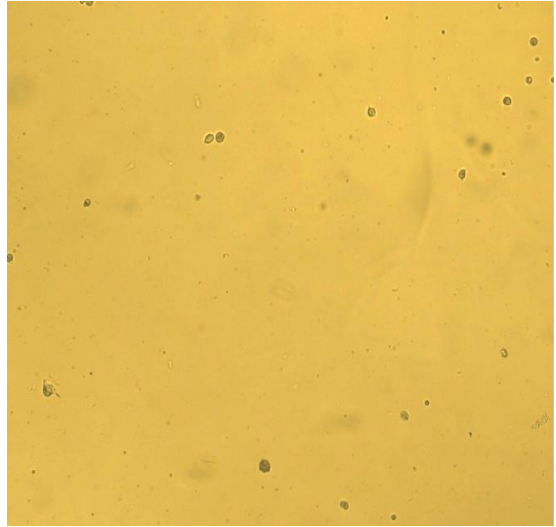
Pozo 1



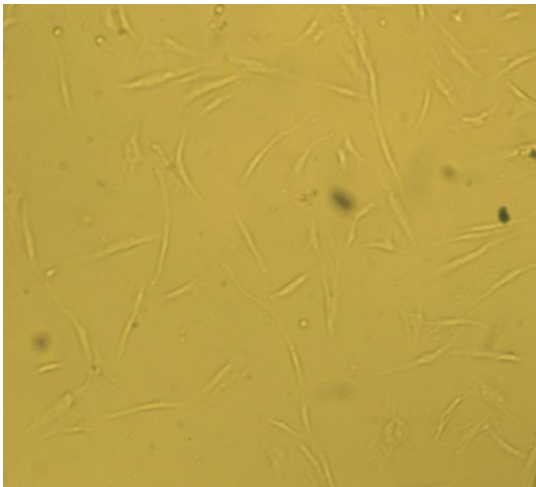
Pozo 2



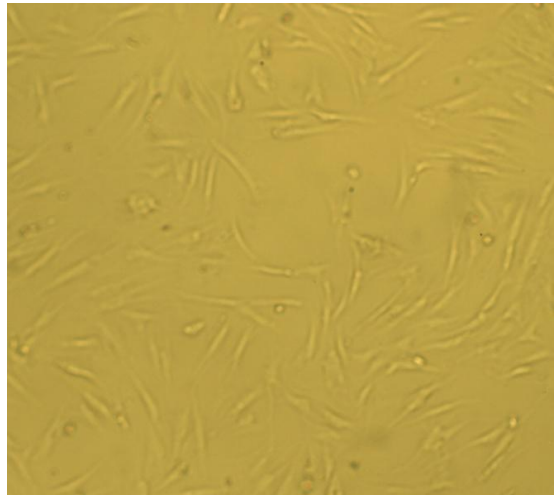
Pozo 3



Pozo 4



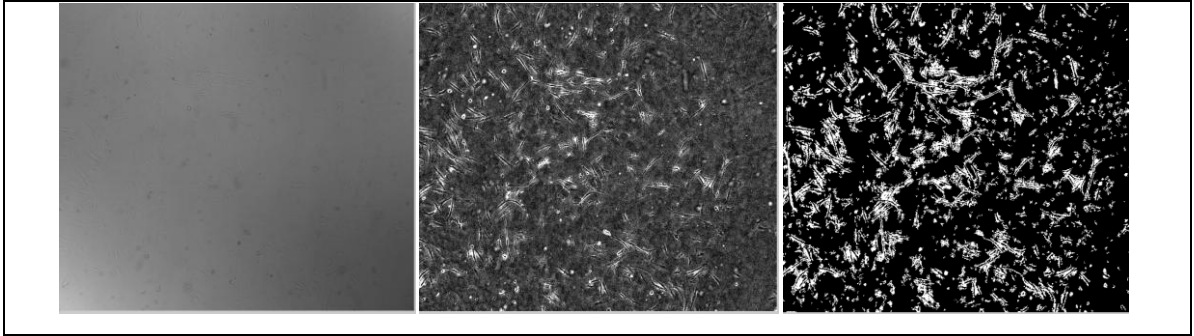
Pozo 5



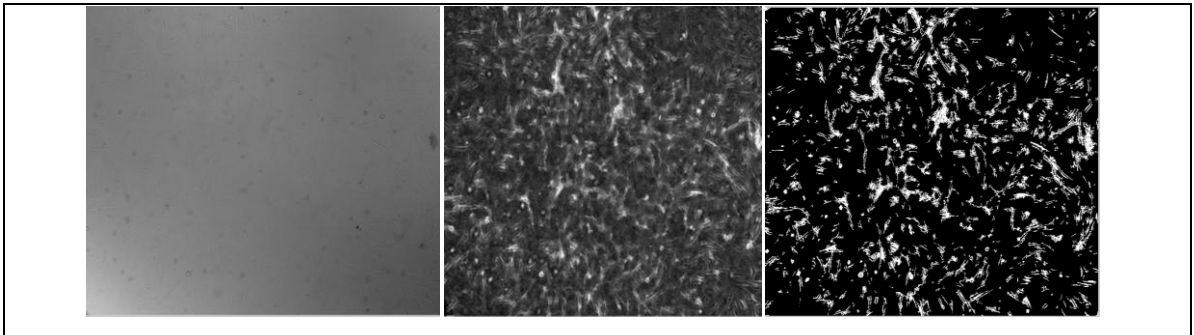
Pozo 6

GRÁFICA 3.2. Fotografías comparativas de los pozos de cultivo.

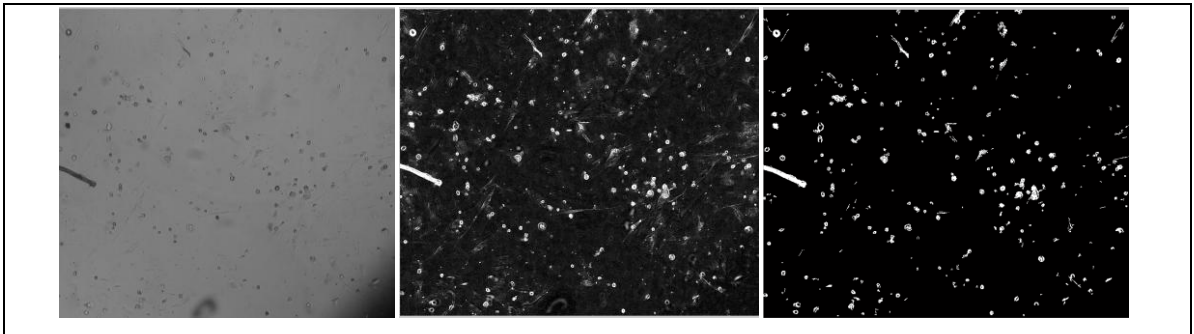
Mediante el análisis de imágenes, se determina la presencia de células en el campo visual mediante un conteo de células comparativo para correlacionar los datos entregados en el análisis, con la observación que se tuvo al microscopio de luz invertida



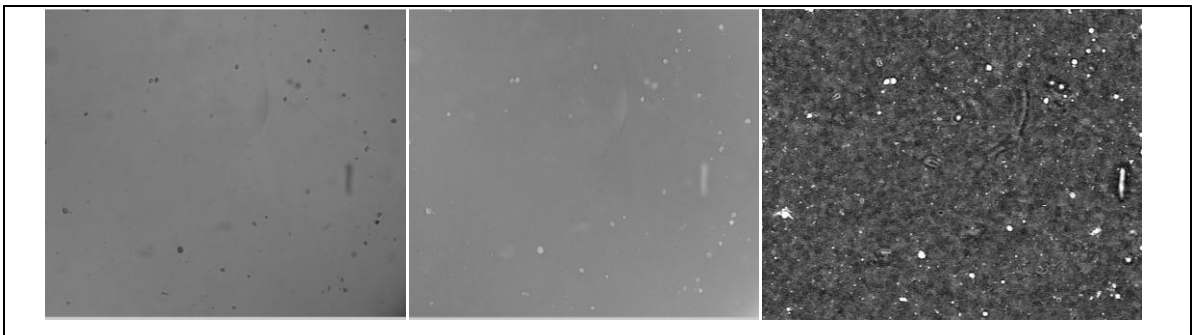
Pozo 1 = objetos 1345 y área del objeto 295.



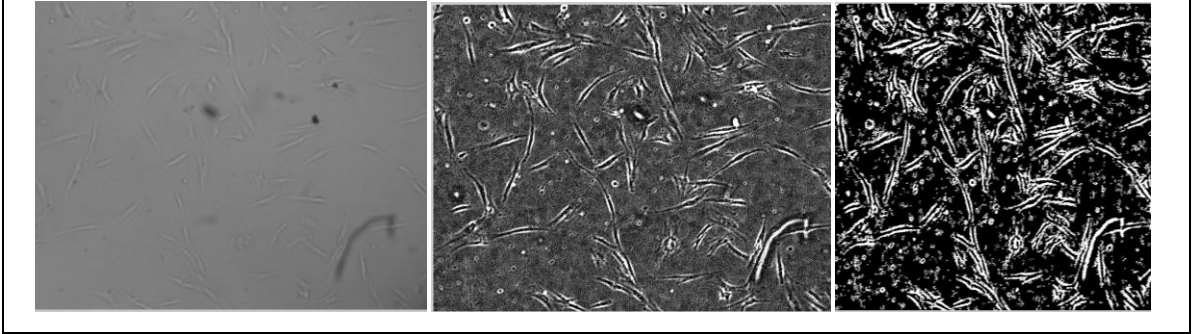
Pozo 2 = objetos 1482 y área del objeto 203.



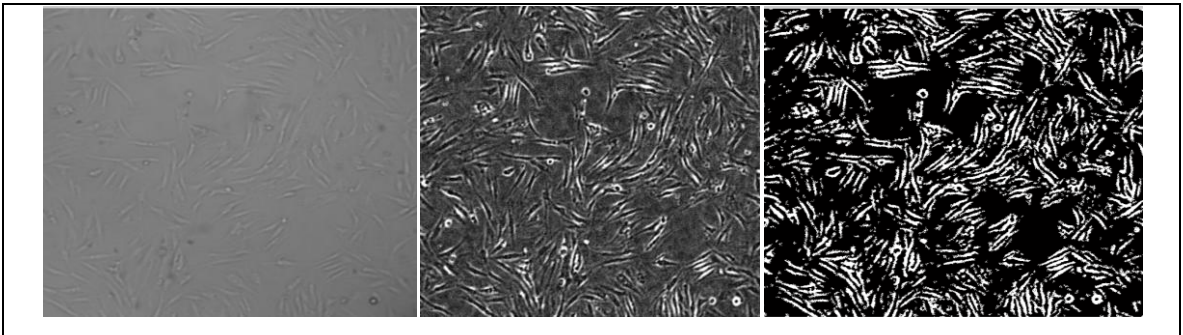
Pozo 3 = objetos 316 y área del objeto 149.



Pozo 4 = objetos 1770 y área del objeto 98.



Pozo 5 = objetos 1553 y área del objeto 228.



Pozo 6 = objetos 1199 y área del objeto 425.

GRÁFICA 3.3. Análisis de imágenes de pozos de cultivo. Se compara los pozos de cultivo de fibroblastos con diferentes concentraciones de ácido hialurónico. Pozo 1 y 2, ácido hialurónico 2 %, pozo 3 y 4 ácido hialurónico 12 %, Pozo 5 y 6 sin ácido hialurónico.

El análisis de imágenes por computador nos muestra el número de objetos encontrados y el área del objeto [ans], donde uno es la cantidad de células por pozo y el otro el tamaño estimado de cada objeto. Se encontró una cantidad promedio de objetos por pozo de 1277 objetos (314-1770); sin embargo, el pozo 3 tuvo un conteo significativamente menor respecto a los demás pozos. No obstante, el pozo 4 que se sembró con los mismos elementos que el pozo 3 si siguió un comportamiento similar al del resto del grupo. No se encontraron diferencias significativas en los cultivos sembrado con 2% ó 12% de concentración de ácido hialurónico ni en aquellos que no tenían aditivo.

El análisis visual de los pozos permitió identificar que la adhesión celular en los pozos con ácido hialurónico a la concentración más alta era menor; sin embargo, hubo buena adherencia de los fibroblastos a la superficie del pozo.

3.2. Fase 2: Evaluación de resultados de inyección de los rellenos subdérmico y resultados e histopatología

Posterior a la inyección de los rellenos subdérmicos, se midieron las masas obtenidas bajo evaluación fotográfica. Gráfica 3.4

Animal #1 se obtuvo una masa de 22 x 17mm de diámetro.

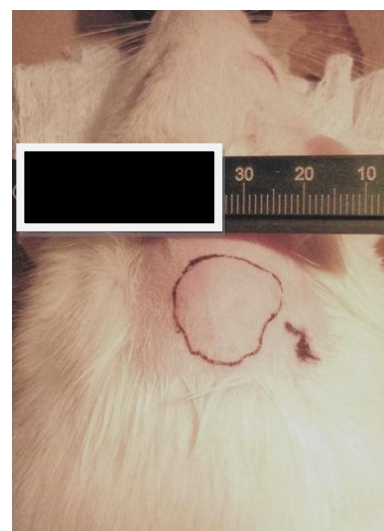
Animal #2 se obtuvo una masa de 19 x 20mm de diámetro.

Animal #3 se obtuvo una masa de 23 x 22mm de diámetro.

Animal #4 se obtuvo una masa de 24 x 23mm de diámetro.



ANIMAL 1



ANIMAL 2



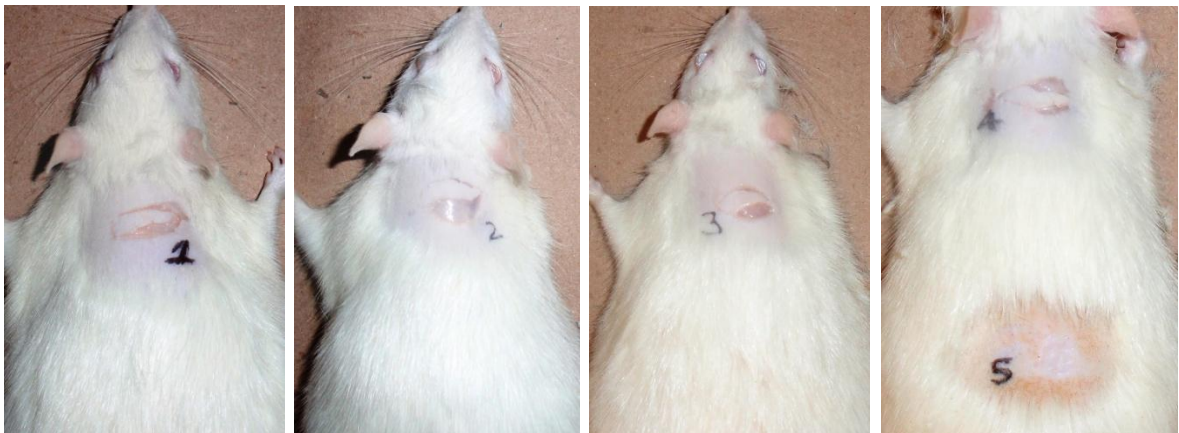
ANIMAL 3



ANIMAL 4

GRÁFICA 3.4. Inyección del material de relleno en la zona cervical de los animales.

De acuerdo a la lectura, se designaron los animales una numeración para la toma de las muestras. Acorde a esto se observo lo siguiente.



GRÁFICA 3.5. Toma de las muestras de los animales de 1 a 5.

Previo a la realización de la biopsia, se toma una fotografía de la zona del implante, mostrando que en el momento de la aplicación no se encontraba ningún efecto de volumen.

Muestra #1, relleno de ácido hialurónico 15mg/ml. Epidermis sin cambios, se observan fibras de colágeno organizadas a nivel de la dermis. El tejido celular subcutáneo muestra adipocitos organizados y una zona central con fibrosis septal leve. Grafica 3.6.

Muestra #2, relleno de ácido hialurónico 15mg/ml y trasplante 1×10^6 fibroblastos. Epidermis normal, se observan fibras de colágeno organizadas a nivel de la dermis. Se observa una zona con proceso inflamatorio linfocitario localizado en el fondo del tejido celular subcutáneo y presencia de fibras colágenas inmaduras y fibroblastos en proceso de división. Gráfica 3.7.

Muestra #3, relleno de ácido hialurónico 15mg/ml y trasplante de 1×10^6 fibroblastos. La epidermis es de aspecto normal. Hay fibras colágeno organizadas en la dermis y sus anexos.

Muestras # 4, trasplante de 1×10^6 fibroblastos y la muestra 5, correspondiente al control de piel normal, se encontraron cambios correspondientes a piel sin cambios epidérmicos, dérmicos o en tejido celular subcutáneo.

En ninguna de las muestras examinadas se encontró formación de granulomas a cuerpo extraño, presencia de elementos que sugirieran infecciones por micobacterias o por hongos subdérmicos. Tampoco se observaron reacciones inflamatorias crónicas, ni estados de necrosis o vasculitis en la zona de inyección del material.

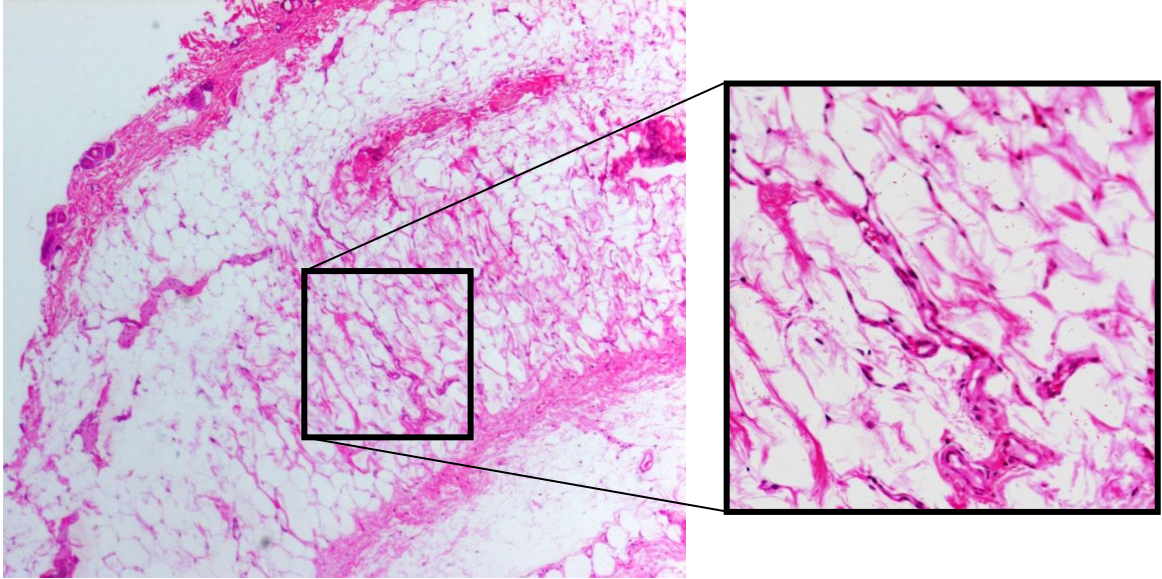


Lámina 1. Fibrosis en tejido celular subcutáneo - 2x panorámica. Correspondiente al animal #1

GRÁFICA 3.6. Placas de histopatología de la zona cervical tomada en biopsia del animal 1.

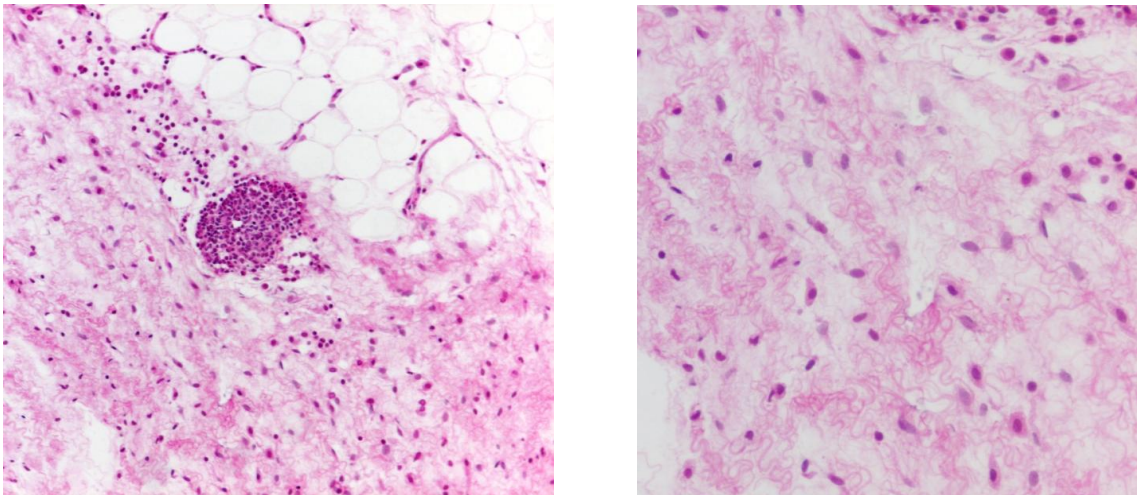


Lámina 2. Zona de inflamación con tejido colágeno inmaduro y células de apariencia fusiforme tipo fibroblastos en formación. Correspondiente al animal #2

GRÁFICA 3.7. Placas de histopatología de la zona cervical tomada en biopsia del animal 2.

4. Discusión

Uno de los objetivos de la medicina ha sido el de generar tratamientos que permitan recuperar las condiciones perdidas de los diferentes tejidos como el de la piel, en cuyo caso se han utilizado componentes como el colágeno y de manera innovadora el ácido hialurónico con el fin de desarrollar rellenos subdérmicos, los cuales que ya han sido probados en más de 750000 personas por año en los Estados Unidos (14,25,38)

Diferentes estudios han demostrado que el ácido hialurónico se deposita en zonas de los tejidos donde no hay compactación de las fibras de colágeno, como por ejemplo en la dermis espongiótica y en la hipodermis. (39) La acción del ácido hialurónico no sólo produce un efecto de llenado espacial en los tejidos sino que también actúa como comunicador celular, favoreciendo el transporte de nutrientes y la interacción de los movimientos celulares. Además de esto, este compuesto tiene propiedades antiangiogénicas y moduladoras de la respuesta inflamatoria e inclusive con efectos de inmunosupresión en algunos casos, (14) participa en el proceso de cicatrización al parecer a través de un mecanismo de señalización dependiente de la interacción de la heparina con el factor de crecimiento epidérmico. (40,41)

El hecho de tener el ácido hialurónico la misma estructura y la misma unidad monomérica en diferentes especies, (13) ha permitido su fácil producción industrial, existiendo como medio de producción el ácido hialurónico de origen animal como el de cresta de gallo y de origen bacteriano como el del *Streptococcus equi*, con menos endotoxinas, (20) los cuales no han mostrado diferencias grandes en su aplicación clínica. (24) La importancia clínica de esto es que no se han visto diferencias en los resultados de tratamiento de los pacientes implantados con ácido hialurónico de distinta fuente.

En la producción de rellenos subdérmicos, el ácido hialurónico se puede fabricar en su estructura mediante la ubicación de dos tipos de relación espacial: cruzadas o no cruzadas. El cruzamiento de las moléculas se puede hacer con diferentes estabilizadores como el 1,4-butanediol biglicídico y p-fenilene bisetil carbodi-imida, lo cual brinda mayor solidez al compuesto, (25) disminuye su absorción y aumenta la dureza y la viscosidad. (2) No obstante estos arreglos químicos, la vida media del ácido hialurónico después de su aplicación oscila entre 6 meses y un año. (23)

Dado este tiempo tan corto de sobrevivencia de los rellenos subdérmicos fabricados con elementos propios de la matriz extracelular como el ácido hialurónico, se han planteado nuevas estrategias como el uso de compuestos combinados con fibroblastos humanos, esto con el objetivo de aumentar el tiempo de duración del implante. (23) En 1998 se evaluó por primera vez el uso de trasplante con fibroblastos autólogos asociados a implantes de colágeno; sin embargo, dicho estudio no definió si existía mejoría clínica o cosmética significativa o si bien se prolongaba por más tiempo el efecto del relleno. (30) Más adelante Watson y colaboradores publicaron un estudio donde se utilizaron fibroblastos como elemento único del implante para el tratamiento de depresiones y ríptides, con resultados cosméticos aceptables. En este trabajo se hizo un análisis histológico y se encontró aumento de la densidad celular. Sin embargo, cabe aclarar que esta investigación no comparó los elementos de su implante con otros tratamientos o placebo. (32) Otros estudios han utilizado marcadores citométricos para garantizar la ubicación de los fibroblastos tiempo después de realizado el implante para así corroborar la permanencia de éstos. (33) No obstante los diferentes estudios realizados a la fecha, la evidencia respecto al uso de fibroblastos en los rellenos subdérmicos no es muy fuerte y no se ha corroborado claramente su eficacia frente a otros compuestos utilizados. (42) Tal vez uno de los factores que no ha sido evaluado adecuadamente es el relacionado con la celularidad, es decir con la cantidad de células implantadas dentro del mismo proceso pues no es lo mismo colocar mil células que un millón. La diferencia está fundamentalmente en su capacidad de generar más elementos de la matriz extracelular recuperando así parte de la dinámica perdida como consecuencia del envejecimiento. Aunque desde el punto de vista de la proliferación las mil células pueden evidenciar una gran actividad in vitro, no así in vivo donde deben competir con las condiciones de su

medio que no son igual que el medio in vitro, por ello considero que la celularidad es un factor que debería considerarse aquí.

Con el fin de obtener mejores resultados, se inició el desarrollo de rellenos subdérmicos, que tuvieran el componente estructural del ácido hialurónico y la acción celular de los fibroblastos. (31) Los primeros estudios que se realizaron en animales demostraron un buen nivel de seguridad dada la ausencia de efectos adversos y aunque se pudo determinar la neoformación de colágeno tipo I, no se pudo evaluar si habían fibroblastos viables dentro de los implantes. (31) Posteriormente se hicieron estudios que incluían relleno subdérmico con ácido hialurónico e implante de fibroblastos pero en mayor densidad que en experimentos anteriores [30×10^6 células]. El análisis histológico de estos experimentos en animales reveló cambios en la migración vascular y en la generación de tejido colágeno; de igual manera que en estudios anteriores, no se reportaron efectos adversos. (35) Teniendo en cuenta que no se conoce si las células implantadas son viables o no y si permanecían en el tejido receptor, se hicieron estudios en modelos murinos con inyección de fibroblastos a los cuales se les hizo seguimiento mediante Reacción de cadena de polimerasa. (18) Mientras que, el seguimiento de la reorganización del ácido hialurónico después de los implantes se realiza mediante estudios de iontoforesis. (43) Si bien los diferentes estudios no han reportado efectos adversos al procedimiento, los diferentes análisis histológicos demuestran que tras el implante ocurre una respuesta inflamatoria por parte del tejido huésped en las primeras 4 semanas y un proceso de degradación ocho meses después. (14)

Los estudios sugieren que la presencia de ácido hialurónico disminuye la adhesión de los fibroblastos en cultivo. (44) Más aún, se ha evaluado que altas concentraciones de ácido hialurónico parecen cambiar las características morfológicas de los fibroblastos, haciéndolos más delgados y permitiendo con ello generar uniones a distancia. (44) Un efecto deletéreo es que este compuesto parece afectar la secreción de colágeno por parte de las células, (45) lo cual puede alterar los mecanismos de remodelación en la piel. (18,39,46)

En este estudio se comprobó que los fibroblastos cultivados con ácido hialurónico a la concentración más alta se desprendían de la superficie de los pozos de cultivo evidenciándose así una pérdida parcial de la viabilidad celular; sin embargo, dado que un porcentaje importante de fibroblastos permanecían adheridos, se puede especular que dichas células serían capaces de llegar a continuar proliferando a pesar del retraso en el tiempo de división celular que produce el ácido hialurónico. Es deseable entonces hacer mas ensayos para analizar el comportamiento de los fibroblastos a mas tiempo de exposición al acido hialurónico en altas concentraciones.

Contrario a lo anterior, otros investigadores han reportado que el ácido hialurónico tiene acciones sobre el ciclo celular, disminuyendo la apoptosis en fibroblastos de ratón. (44) *In vivo* esta característica se ha utilizado para estimular la producción de colágeno en células con una sobrevivida mayor; sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre no es claro, (45) ya que se desconoce si el efecto en el ciclo celular depende de la concentración de ácido hialurónico o de las condiciones del espacio extracelular. Dilucidar este mecanismo, podría ser útil para optimizar los resultados de los implantes lo que implica la realización de ensayos y su evaluación en citometría de flujo.

La asociación de ácido hialurónico y fibroblastos en implantes subdérmicos en modelos murinos en estudios previos no presentó ningún efecto adverso clínico de reacción cutánea, ni en la histología con ausencia de granulomas, reacciones a cuerpo extraño, vasculitis o necrosis. (31) En estudios que se hicieron seguimiento escanográfico y de PCR de las células del tejido implantado no mostró diferencias en los resultados de los implantes para la presencia de efectos clínicos respecto a los controles. (18) El análisis histológico en otros rellenos subdérmicos de ácido hialurónico y fibroblastos no evidenció zonas de necrosis o granulomas. (35) En nuestro estudio en ratas Wistar, los resultados histológicos fueron similares. No se tuvo ninguna reacción a cuerpo extraño, granulomas, presencia de infecciones, vasculitis o necrosis. La aplicación en los animales fue segura, sin la presencia de efectos adversos no esperados. El comportamiento de los animales fue totalmente normal, no hubo manifestaciones de dolor, diestrés o incomodidad; los animales mantuvieron una actitud alerta permanente, se recrearon y acicalaron dentro de los parámetros de normalidad etológica la evaluación

histológica y clínica nos lleva a la normalidad. Este estudio evalúa la seguridad de la combinación de fibroblastos y ácido hialurónico que mediante esta técnica es segura en los animales independientemente de la concentración de fibroblastos. Este es un aporte importante para la seguridad posterior del trabajo clínico, de ésta manera se está dando cumplimiento a un requerimiento establecido en las Pautas Éticas Internacionales para investigación en seres humanos y por el otro lado se está evidenciando el comportamiento del relleno en un organismo completo lo que implica que hay mayor información para mayor seguridad en los procedimientos en humanos. Aunque es claro que este tipo de ensayos son de evaluación crónica, es decir son ensayos de corta duración; no tan corta como las pruebas agudas pero igual no nos dan información sobre efectos tardíos.

A pesar de que no se encontraron efectos adversos, éstos pueden ocurrir de manera retardada, al parecer por un mecanismo en el que participan los receptores CD44 presentes en los monocitos – macrófagos, los cuales al activarse desencadena la síntesis de la enzima hialuronidasa, la cual hidroliza el ácido hialurónico facilitando el proceso de fagocitosis; sin embargo, al morir los macrófagos liberan la sustancia la cual puede causar los efectos adversos. (24)

Respecto al uso de ácido hialurónico, se ha visto con poca frecuencia la presencia de granulomas o infecciones por micobacterias, (14) muy posiblemente gracias a los adecuados procesos de esterilidad que se llevan a cabo durante la preparación del producto. (49) Por el contrario, se encuentra con mayor frecuencia, pero con menor relevancia clínica, la aparición de un eritema retardado en el 8% de los pacientes. Las reacciones de hipersensibilidad asociadas a su inyección se describen en menos de 1 en 5000 pacientes tratados, tanto así que, los efectos adversos mayores como granulomas, angioedema reactivo y procesos inflamatorios crónicos suelen reportarse como casos aislados. (14,23,50)

La implementación de protocolos con rellenos subdérmicos que incluyan células autólogas y aditivos como ácido hialurónico en seres humanos requiere disminuir el

tiempo de cultivo necesario para obtener la cantidad necesaria de fibroblastos para los implantes en los pacientes por lo que en esos casos es importante incluir el uso de biorreactores que aceleran los procesos de proliferación celular dando mejores condiciones al cultivo además totalmente controlables.

Dado que los cultivos celulares tienen la susceptibilidad de contaminarse, una vez se obtenga el número de células necesarias para el implante, se debe contar con dispositivos diseñados para el almacenamiento y el transporte de las células que preserve el ambiente estéril antes del implante en los pacientes. (49) Además de valorar los fibroblastos en condiciones diferentes para su asociación con ácido hialurónico (51).

Se necesitan más estudios para evaluar la posibilidad de iniciar protocolos de experimentación con seres humanos en los cuales se realice estos implantes. Este es un estudio piloto en el cual se pudieron definir una serie de condiciones que garantizan la posible continuidad del trabajo. Sería deseable que un nuevo residente continúe con éste proceso, realizando los ensayos y pruebas sugeridas.

5. Conclusiones

1. Los fibroblastos cultivados *in vitro* en altas concentraciones de ácido hialurónico mantienen una buena viabilidad a pesar de que se observa una disminución en la adhesión de algunas; sin embargo, este no parece afectar la proliferación celular. Esto tiene importancia para comprender los efectos biológicos que podría tener *in vivo* al realizar el implante. Si los fibroblastos son viables asociado al ácido hialurónico *in vitro*, posiblemente *in vivo*, los fibroblastos implantados sean igualmente viables en esta implante, lo cual no siempre es extrapolable.
2. El estudio demostró una seguridad confiable en la aplicación del implante subdérmico en el modelo animal, dado que no se observaron efectos adversos como granulomas a cuerpo extraño, reacciones inflamatorias crónicas o infecciones; por lo que, es posible manejar el mismo protocolo de aplicación en seres humanos.
3. Es necesario diseñar nuevos estudios experimentales para la aplicación de este implante subdérmico donde se evalúen variables diferentes a los efectos adversos, como el aumento en la perdurabilidad del implante, la posibilidad de generar un sistema de transporte seguro para el riesgo de contaminación, y la viabilidad económica del proyecto.

6. Bibliografía

1. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair, *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19.
2. Kligman AM, Graham JA. The psychology of appearance in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1989;5:213-22.
3. Rodriguez L. La piel revela nuestra historia personal. <http://www.elcolectivolondres.com/cultural2.php?id=108>.
4. Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*, Springer-Verlag Berlin 2005 pags 1-19.
5. Yaar M, Glichrest BA. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, aging of the Skin, Chapter 108 pags 963-74.
6. Concepción AR, Peña R, Acosta J, González A Griego. Algunas características de la piel, fotoenvejecimiento y cremas antifotoenvejecimiento *Rev Cubana Invest Bioméd* 2007;26(2).
7. Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*, Springer-Verlag Berlin 2005 pags 29-51.
8. De Maio M, Rzany B. *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. Springer-Verlag 2007 1ra edición. Pags 1-54.
9. Cockerham K, Hsu VJ. Collagen-Based Dermal Fillers: Past, Present, Future. *Facial Plast Surg* 2009;25:106-13.
10. Goldberg DJ. *Laser Dermatology*. Springer-Verlag Berlin 2005. .
11. Rabello-Fonseca RM, Azulay DR, Luiz RR, Mandarim-de-Lacerda CA, Cuzzi T, Manela-Azulay M. Oral isotretinoin in photoaging: clinical and histopathological evidence of efficacy of an off-label indication. *JEADV* 2009;23:115–23.

12. Lipozenčić J, Mokos ZB. Dermatologic Lasers in the Treatment of Aging Skin. *Acta Dermatovenerol Croat* 2010;18(3):176-80.
13. Beasley KL, Weiss MA, Weiss RA. Hyaluronic Acid Fillers: A Comprehensive. *Facial Plast Surg* 2009;25(2):86-94.
14. Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(4):509-19.
15. Hata K. Current issues regarding skin substitutes using living cells as industrial materials. *J Artif Organs*. 2007;10(3):129-32.
16. Wong T, McGrath JA, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1149-55.
17. Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns*. 2010;36(4):450-60.
18. Altman AM, Abdul Khalek FJ, Seidensticker M, Pinilla S, Coleman YYM, Yao-Hua S y cols. Human Tissue-Resident Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid Gel Provide Fibrovascular-Integrated Soft-Tissue Augmentation in a Murine Photoaged Skin Model. *Plast Reconstr Surg* 2010;125: 63-72.
19. Fagien S, Stuzin J. Injectable Soft-Tissue Augmentation: The Present and the Future. *Plastic Reconstructive Surg* 2007;Nov(suppl):5-7s.
20. Rivkin A. New Fillers under Consideration: What Is the Future of Injectable Aesthetics?. *Facial Plast Surg* 2009;25:120-3.
21. Limpiangkanan W, Limpiangkanan W. Photo-Aging: A Literature Review *J Med Assoc Thai* 2010;93(6):753-7.
22. Lindqvist C, Tveten S, Bondevik BE, Fagrell D. A Randomized, Evaluator-Blind, Multicenter Comparison of the Efficacy and Tolerability of Perlane versus Zyplast in the Correction of Nasolabial Folds. *Plast. Reconstr. Surg* 2005;115: 282-9.
23. Winslow CP. The Management of Dermal Filler Complications. *Facial Plast Surg* 2009;25(2); 124-8.

24. Clark CP. Animal-Based Hyaluronic Acid Fillers: Scientific and Technical Considerations *Plast Reconstr Surg* 2007;120(Suppl.): 27-32S.
25. Bentkover SH. The Biology of Facial Fillers *Plast Surg* 2009;25:73–85.
26. Weiss JM, Renkl AC, Ahrens T, Moll J, Mai BH, Denfeld RW y cols. Activation-Dependent Modulation of Hyaluronate-Receptor Expression and of Hyaluronate-Avidity by Human Monocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111:227–32.
27. Vleggaar D. Poly-L-lactic acid: consultation on the injection techniques. *JEADV* 2006;20 (Suppl. 1): 17–21.
28. Ridenour B, Kontis TC. Injectable Calcium Hydroxylapatite Microspheres (Radiesse). *Facial Plast Surg* 2009;25:100-5.
29. Thioly-Bensoussan D. A new option for volumetric restoration: poly-L-lactic acid. *JEADV* 2006; 20(Suppl. 1): 12–6.
30. West TB, Alster TS. Autologous Human Collagen and Dermal Fibroblasts for Soft Tissue Augmentation. *Dermatol Surg* 1998;24(5):510–2.
31. Eul-Sik Y, Seung-Kyu H, Woo-Kyung K. Advantages of the Presence of Living Dermal Fibroblasts Within Restylane for Soft Tissue Augmentation. *Ann Plast Surg* 2003;51: 587–92.
32. Watson D, Keller GS, Lacombe V, Fodor PB, Rawnsley J, Lask GP. Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A pilot study. *Arch Facial Plast Surg* 1999;1(3):165–70.
33. Nilforoushzadeh MA, Siadat AH, Arianrad M, Moulavi F, Baradaran EH, Esfahani MH. Soft tissue augmentation by autologous cultured fibroblasts transplantation for treatment of wrinkles and scars: a case series of 20 patients. *J Res Med Sci* 2010;15(3):167-71.
34. Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, phase III clinical trial. *Dermatol Surg*. 2007;33(3):263–8.

35. Solakoglu S, Tiryaki T, Ciloglu SE. The Effect of Cultured Autologous Fibroblasts on Longevity of Cross-Linked Hyaluronic Acid Used as A Filler. *Aesthetic Surg J* 2008;28:412-6.
36. Cardozo CA, Mrad A, Martinez C, Rodriguez E, Lolas F. El animal como sujeto experimental Aspectos técnicos y éticos. CIEB Universidad de Chile, Mayo 2007, 1ra edición. pags 103-30.
37. Oh EJ, Kim TK, Shin JH, Choi JH, Chung HY. Biologic filler using human fibroblasts and placenta extracts. *J Craniofac Surg* 2011;22(5):1557-60.
38. Grimes PE, Thomas JA, Murphy DK. Safety and effectiveness of hyaluronic acid fillers in skin of color. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2009; 8: 162-8.
39. Azevedo RA, Carvalho HF, Brito-Gitirana L. Hyaluronan in the epidermal and the dermal extracellular matrix: Its role in cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. *Micron* 2007;38:607-10.
40. Kubo K, Kuroyanagi Y. Spongy matrix of hyaluronic acid and collagen as a cultured dermal substitute: evaluation in an animal test. *J Artif Organs* 2003; 6:64–70.
41. Monslow J, Sato N, Mack JA, Maytin EV. Wounding-Induced Synthesis of Hyaluronic Acid in Organotypic Epidermal Cultures Requires the Release of Heparin-Binding EGF and Activation of the EGFR. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129:2046-58.
42. Monteagudo CA, Marín MG, Enriquez F, Penilla I, Kröttsch E, Cano S. *Caracterización clínica de injertos autólogos a partir de fibroblastos gingivales crecidos sobre una matriz biológica para el tratamiento de recesiones gingivales: Reporte de un caso clínico. Rev Mex Odontol* 2009;13:115-21.
43. Pacini S, Punzi T, Gulisano M, Ruggiero M. Pulsed current iontophoresis of hyaluronic acid in living rat skin. *Journal of Dermatological Science* 2006;44: 169-71.
44. Boraldi F, Croce MA, Quaglino D, Sammarco R, Carnevali E, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I. Cell–matrix interactions of in vitro human skin fibroblasts. *Tissue & Cell* 2003;35:37–45.

45. Meyer LJ, Russell SB, Russell JD, Trupin JS, Egbert BM, Shuster S, Stern R. Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2000;114(5):953-9.
46. Croce MA, Dyne K, Boraldi F, Quaglino D. Jr, Cetta G, Tiozzo R, Pasquali-Ronchetti I. Hyaluronan affects protein and collagen synthesis by in vitro human skin fibroblasts. *Tissue & Cell* 2001;33(4):326-31.
47. Neuman MG, Oruña L, Coto G, Lago G, Nanau R, Vincent M. Hyaluronic acid signals for repair in ethanol-induced apoptosis in skin cells in vitro. *Clin Biochem* 2010;43:822–26.
48. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, Voorhees JJ. In Vivo Stimulation of De Novo Collagen Production Caused by Cross-linked Hyaluronic Acid Dermal Filler Injections in Photodamaged Human Skin. *Arch Dermatol* 2007;143:155-63.
49. Bellew SG, Carroll KC, Weiss MA, Weiss RA. Sterility of stored nonanimal, stabilized hyaluronic acid gel syringes after patient injection. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:988-90.
50. Andre P, Fléchet ML. Angioedema after ovine hyaluronidase injection for treating hyaluronic acid overcorrection. *J Cosmetic Dermatol* 2008;7:136-8.
51. Rahmani-Neishaboor E, Jackson J, Burt H, Ghahary A. Composite Hydrogel Formulations of Stratifin to Control MMP-1 Expression in Dermal Fibroblasts. *Pharm Res* 2009;26(8):2002-14.