



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ



**GRADO DE DISMINUCIÓN DE ARRUGAS FACIALES TRAS LA APLICACIÓN CUTÁNEA
DE FIBROBLASTOS AUTÓLOGOS CULTIVADOS (FAC) EN SUERO AUTÓLOGO
COMPARADO CON SÓLO LA APLICACIÓN DE SUERO AUTÓLOGO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALIDAD EN:

CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA:

DR. ENRIQUE HERMINIO ORTIZ VILLALOBOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEXANDER CÁRDENAS MEJÍA

NO. DE REGISTRO: **05-62-2015**

MÉXICO D.F A 10 DE AGOSTO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ
AUTORIZACIONES

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación

Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirectora de Investigación

Dr. Antonio Fuente del Campo
Jefe de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva

Dr. Alexander Cárdenas Mejía
Tutor de Tesis

Dr. Andrés E. Castell Rodríguez
Tutor invitado (Externo)

Dr. Miguel Herrera Enríquez
Investigador Asociado (Externo)

Dra. Gisela Reyes Martínez
Investigador Asociado (Externo)

Mtra. Anahí Anzo Osorio
Investigador Asociado (Externo)

Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva, con el apoyo del Departamento de Biología Celular y tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de los doctores Alexander Cárdenas Mejía y Andrés E. Castell Rodríguez.

DEDICATORIA

En esta etapa de mi vida, puedo notar que ha habido tantas personas que han estado siempre apoyándome, que serían dedicatorias interminables; de antemano dedico esta tesis a todos los que confiaron en mí y a los que día a día me han permitido aprender, no sólo desde el punto de vista académico, sino también de la vida. A pesar de ello, en definitiva siempre hay prioridades, como Dios, que nunca me ha dejado sólo e incluso me permite trabajar con él, encaminando mis manos para el beneficio de los pacientes que atiendo en esta carrera que amo con toda mi alma.

Comenzaré por dedicarle esta Tesis a mi padre, “Don Enrique”, que aunque no cuente más con su presencia física, siempre ha estado y estará conmigo, sintiendo su apoyo incondicional en mi hombro; lo llevo no sólo en el nombre, sino en cada día de mi vida, en cada decisión, en mis manos... en mis genes. La fortaleza siempre va acompañada del orden, perseverancia y humildad. Siempre él como un gran roble, como un monumento, como un padre que pocos han tenido y que tuve el privilegio de tener. Yo me debo a ti papá, ahí en el cielo donde seguramente estás y te dedico esta tesis.

Al mismo nivel, cual gran reina de mi padre, dedico esta tesis a mi madre, Gloria. No hay una sola palabra que no le haya dicho antes en agradecimiento; sin embargo, las palabras se vuelven viento; de ahí mi necesidad de plasmar en estos renglones, que también soy y debo a quien tengo como madre. He aquí un logo más, como parte de mi compromiso alguna vez hice hace tiempo, plasmado en un trabajo que no es más que el fruto de ese apoyo incondicional.

A mis hermanos, no por ser alguno más importante que otro, sino por cronología: Lorena, Rosalba, Jaime y Francisco. A ustedes hermanos les dedico también esta tesis con el mismo cariño que a nuestros padres. Siempre pensé que el número “siete” nos representaba como familia nuclear. Ahora cada quién ha comenzado a echar raíces y ha expandido nuestro número inicial. No importa ya cuántos somos, sino quienes somos y a quienes nos debemos; y para fortuna nuestra, representamos los apellidos de dos grandes familias, para integrarse sólidamente en uno mismo y que resonará cada vez aún más alto: ORTIZ VILLALOBOS.

No sin dejar de lado a mis amigos del alma, aquellos que considero mis otros hermanos, que para no herir sus susceptibilidades, obviaré sus nombres por escrito, pero que saben perfectamente que el vínculo es inquebrantable, que estos años de estudio no hubieran sido los mismos sin ustedes, y que estuvieron ahí para ayudarme a levantar o para compartir momentos invaluable de mi vida que no tienen comparación. A ustedes amigos míos, les dedico también esta tesis.

Finalmente, y sólo por ser breve pero no menos importante, dedico esta esta tesis a mis pacientes: personas increíbles y magníficas a las que debo mi formación médica, que más que considerarlos la bien sabida fuente interminable de conocimiento, son un recordatorio de responsabilidad para proveerles no menos que lo mejor de mí, por el entendido de confiar su salud en mis manos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Andrés E. Castell Rodríguez, por confiar en mí y apoyarme hasta el final de este trabajo, por ser un maestro continuo en esta carrera médica que se llama vida; por ser una fuente interminable de inspiración, humildad, enseñanza y amistad, pero por sobre todo, por enseñarme a mirar el futuro con gafas oscuras.

Al Dr. Miguel Herrera Enríquez, por su amistad, apoyo y disposición más que positiva junto con la paciencia necesaria en el arduo trabajo de laboratorio.

A la Dra. Gisela Reyes Martínez, por demostrar tan gran profesionalismo y apoyo inquebrantable en tiempo y espacio para la realización de esta tesis, aunado a su gran amistad que ha perdurado a lo largo de estos años de formación médica.

A la Maestra en Ciencias Anahí Anzo Osorio que me ayudó a mostrar resultados positivos y estadísticamente significativos, no sólo en esta tesis, sino en cualquier ámbito.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	14
FOTOS.....	18
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	25
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

GRADO DE DISMINUCIÓN DE ARRUGAS FACIALES TRAS LA APLICACIÓN CUTÁNEA DE FIBROBLASTOS AUTÓLOGOS CULTIVADOS (FAC) EN SUERO AUTÓLOGO COMPARADO CON SÓLO LA APLICACIÓN DE SUERO AUTÓLOGO

IMPROVEMENT OF FACIAL WRINKLES AFTER CUTANEUS APPLICATION OF AUTOLOGOUS CULTURED FIBROBLAST IN AUTOLOGOUS SERUM COMPARED WITH ONLY THE APPLICATION OF AUTOLOGOUS SERUM

Ortiz VE¹, Cárdenas MA², Herrera EM³, Reyes MG⁴, Anzo OA⁵, Castell RA⁶

¹ Residente de 4° Año de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva. Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

² Jefe de la Clínica Parálisis Facial-Nervio Periférico, Cirugía Plástica y Reconstructiva. Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

³ Investigador del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

⁴ Dermatóloga y Cirujana Dermato-oncóloga. Cirugía Dermatológica, Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

⁵ Licenciada en Nutrición y Maestra en Ciencias. Torre de Investigación. Instituto Nacional de Pediatría.

⁶ Investigador del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cultivar células autólogas en un medio también autólogo (suero) y su posterior aplicación dérmica con el objetivo de que los fibroblastos generen proteínas de matriz extracelular *in situ*, en lugar de aplicar solamente proteínas de matriz extracelular (como ácido hialurónico) es una mejor opción para atenuar los signos del envejecimiento cutáneo como las arrugas y líneas de expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS: Ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego que compara la inyección cutánea de fibroblastos autólogos cultivados (FAC) en suero autólogo vs solo la inyección de suero autólogo. En el grupo de intervención se aplicaron aproximadamente 135 millones de células. Las inyecciones se realizaron en 3 sesiones, con intervalos de 1 mes. Se evaluó clínica y fotográficamente la disminución de arrugas faciales mediante el uso de la escala Lemperle y se aplicó una escala de autosatisfacción en: firmeza, suavidad, hidratación y arrugas, en condiciones pre, y a 2°, 4° y 5° meses de la primera aplicación.

RESULTADOS: Se realizó un análisis *interim* con 40 pacientes, (20 por grupo). El promedio de edad para el grupo experimental (FAC) fue de 48 años y para el grupo control fue de 51 años. No hubo diferencias significativas en sexo, fototipo Fitzpatrick o escala de Glogau entre ambos grupos. El 100% de los pacientes presentó arrugas, en grados variables, en ambos cantos orbitales, comisuras, surcos nasogenianos. Sólo el 25% de los pacientes presentó arrugas en mejillas. Del 50 al 90% de los pacientes presentó algún grado de hiperpigmentación facial. El grupo tratado con FAC mostró mejoría estadísticamente significativa en arrugas (con valores de P acorde al sitio anatómico valorado), desde la medición basal en comparación al 5° mes vs el grupo control. Dicha mejoría se reflejó en al menos 1 o más grados descendentes según la escala de Lemperle, como se verifica al aplicar la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Los sitios de mejoría con mayor significancia estadística fueron glabella y ambos surcos nasolabiales (P < 0.0001, IC 95%); Dicho grupo también mostró mejoría en firmeza, suavidad, hidratación (P < 0.0001, IC 95%), e hiperpigmentación (P = 0.003, IC 95%). Los pacientes tratados con FAC presentaron grados de satisfacción mayores en los rubros de disminución de arrugas, mejoría en firmeza, suavidad e hiperpigmentación en comparación al grupo control (P < 0.0001, IC 95%). El 100 % de los pacientes presentó edema del sitio de punción, sin embargo, fue pasajero y se resolvió en el transcurso de máximo 2 hrs después de la aplicación.

CONCLUSIONES: La aplicación intradérmica de fibroblastos autólogos activados y cultivados en suero autólogo es una terapia segura que atenúa las arrugas y mejora las características cutáneas faciales. Este es el primer estudio de este tipo en población mexicana.

PALABRAS CLAVE: Arrugas faciales, Fibroblastos autólogos cultivados; Hidratación, firmeza y suavidad cutáneas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: culturing autologous cells in a medium also autologous (serum) and their subsequent dermal application in order that fibroblasts generate extracellular matrix proteins in situ, rather than applying only extracellular matrix proteins (such as hyaluronic acid) is a best option to reduce the signs of skin aging such as wrinkles and fine lines.

MATERIALS AND METHODS: Clinical Trial controlled, randomized, double-blind study that compares the injection of autologous fibroblasts cultured (AFC) in autologous serum vs autologous serum injection. In the intervention group about 135 million cells were applied in three sessions, with intervals of 1 month. Facial wrinkles improving were evaluated, clinical and photographically, using the Lemperle scale and a self-satisfaction scale in: firmness, smoothness, hydration and wrinkles, before and 2, 4 and 5 months after the first application.

RESULTS: Was performed an Interim analysis with 40 patients (20 per group). The average age for the experimental group (AFC) was 48 years and for the control group was 51 years. There were no significant differences in sex, skin type Fitzpatrick or Glogau scale between both groups. 100% of patients had wrinkles, to varying degrees, in outer cantal edges, buccal commissures and nasolabial folds. Only 25% of patients had wrinkles on cheeks. 50 to 90% of patients had some degree of facial hyperpigmentation. The AFC-treated group showed statistically significant improvement in wrinkles (with P values according to anatomical site), from basal measurement compared to 5th months after treatment vs the control group. This improvement was reflected in at least 1 or more degrees down in Lemperle scale, as verified by applying the Wilcoxon rank test. The improved sites with greater statistical significance were glabella and both nasolabial folds ($P < 0.0001$, CI 95%). This group also showed improvement in firmness, smoothness, moisture ($P < 0.0001$, CI 95%), and hyperpigmentation ($P = 0.003$, CI 95%). Those treated with AFC had higher degrees of satisfaction in the areas of reduction of wrinkles, improved firmness, smoothness and hyperpigmentation compared to the control group ($P < 0.0001$, 95%). 100% of patients had edema in the puncture sites, however, was transient and resolved during maximum 2 hours after application.

CONCLUSIONS: The intradermal injection of autologous fibroblasts activated and cultured in autologous serum is a safe therapy that improves skin wrinkles and facial features. This is the first study in this kind in Mexican population.

KEYWORDS: Facial Wrinkles, Autologous cultured fibroblast, skin moisture, skin softness and firmness.

INTRODUCCIÓN

EL ENVEJECIMIENTO FACIAL

La piel envejecida cronológicamente pierde proteínas dérmicas estructurales, como colágena¹ y elastina, apreciándose adelgazada, flácida y con arrugas. Existe influencia de la dieta, los estilos de vida, la historia de consumo de alcohol y/o tabaco, la exposición solar crónica (fotoenvejecimiento)^{2,3} y otros, como los radicales libres⁴.

Una de las zonas más notorias del proceso de envejecimiento es la piel del rostro: Los signos tempranos de envejecimiento comienzan desde los treinta tardíos en el tercio facial inferior. Hacia inicios de los 40 años hay cambios periorbitarios, con descenso de la porción lateral de la ceja.⁵ A la mitad de los 40 años, el surco nasolabial se profundiza.⁶ Durante los sesenta, setenta y ochenta hay una atrofia progresiva de tejidos blandos, más una remodelación ósea máxilo-mandibular que exacerba el envejecimiento facial.⁷ En los últimos años ha aumentado la demanda de pacientes que desean atenuar dichos signos.⁸

TRATAMIENTO PARA EL ENVEJECIMIENTO FACIAL

A lo largo del tiempo, se han utilizado distintos tratamientos para regenerar la piel envejecida, pero han presentado una eficacia limitada y algunos efectos adversos.⁹ Actualmente hay materiales con mejor perfil de bioseguridad como el ácido hialurónico.^{10,11,12.}

En la actualidad, no hay un tratamiento convencional para el manejo de las arrugas o ritides faciales. Así, se han utilizado desde procedimientos quirúrgicos de suspensión facial hasta “no quirúrgicos” generados por la industria farmacéutica con el fin de mejorar las estructuras cutáneas que se van deteriorando. De esta manera, se han aplicado las siguientes terapéuticas sin que alguna conforme el estándar de oro de manejo: 1) toxina botulínica,¹³ 2) inyección dérmica de microinjertos de grasa autóloga,¹⁴ el ácido hialurónico¹⁵ o dermis autóloga inyectable,¹⁶ 3) láser o de luz pulsada intensa,¹⁷ 4) retinoides¹⁸ e 5) inyección de fracciones sanguíneas (ej. plasma rico en plaquetas)¹⁹

Uno de los rellenos dérmicos actuales, más utilizados es el ácido hialurónico por su alto perfil de bioseguridad y efecto inmediato de volumen.²⁰ Con respecto al envejecimiento cutáneo, se sabe éste disminuye con la edad²¹. Así, su aplicación como forma de restituir dicha estructura se ha vuelto común, sin embargo sus costos son elevados y sus efectos pueden oscilar entre 6 meses a un año,²² casi el doble de duración comparado a la colágena inyectable.²³

Más allá del efecto directo del ácido hialurónico como relleno, aunado a la edad se observa que los fibroblastos dejan de producir fibras de colágena tipo I y III; esto es, se tornan inactivos (fibrocitos), adoptan una forma redonda, y aún más, producen metaloproteinasas que aumentan la degradación de la matriz restante. Los efectos benéficos de la aplicación de ácido hialurónico son resultado de una interacción mediada por receptor: Los fibroblastos se pueden unir a ácido hialurónico vía varios receptores, incluyendo el de CD44, el receptor para la motilidad mediada por hialuronato y otras moléculas de adhesión intercelulares.²⁴ Dicha unión puede generar activación celular, migración, actividad inflamatoria y otros procesos. Aunado a esto, se ha observado que el aumento de la tensión mecánica en la matriz extracelular induce un alargamiento de los fibroblastos y la estimulación en la síntesis de colágena. Las inyecciones de ácido hialurónico inducen incremento en la producción de colágena por alargamiento mecánico

de los fibroblastos, estimulación de factores de crecimiento, inhibición en la expresión de metaloproteinasas así como aumento en la inducción de factores inhibidores de las mismas²⁵

LA INGENIERÍA TISULAR Y USO DE SUERO AUTÓLOGO

La ingeniería tisular busca mejorar la función de los tejidos²⁶. Puede identificar, aislar y manipular poblaciones celulares definidas para aumentar los procesos regenerativo y reparativo mediante proliferación y diferenciación celulares.^{27,28} Dicha manipulación se puede realizar con moléculas, como los factores de crecimiento, embebidos en andamios o medios de cultivo que también pueden usarse como vehículos de aplicación, como la solución salina o el suero sanguíneo.^{29,30} De este último se prefiere el autólogo por carecer de antigenicidad y evita el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, además, ha tenido diferentes aplicaciones en medicina^{31,32,33}, todas ellas y con efectos mínimos, leves y de duración corta en caso de su aplicación intradérmica (eritema, equimosis y edema)³⁴. Por dichas propiedades, el suero autólogo en la ingeniería tisular, se usa como medio de cultivo celular y como vehículo de aplicación, por ser seguro e inocuo.³⁵

FIBROBLASTOS EN LA INGENIERÍA TISULAR

Los fibroblastos son células que se encuentran en la piel (dermis) y en otros órganos. Son críticos en el proceso de cicatrización de heridas. Además de producir proteínas de matriz extracelular y la contractura de heridas, se sugiere que tiene la capacidad de “reprogramar” la piel con el propósito de rejuvenecerla³⁶

En el 2012, Castro (2012) realizó un estudio experimental en cuatro ratas Wistar, en el que aplicó fibroblastos junto con ácido hialurónico y concluyó que este procedimiento es una técnica segura en animales, por lo que, es posible manejar el mismo protocolo de aplicación en seres humanos.³⁷

INGENIERÍA TISULAR APLICADA AL ENVEJECIMIENTO

Con respecto a la piel, los métodos de ingeniería tisular se han basado, por ejemplo en la siembra de fibroblastos embebidos en andamios dérmicos naturales o sintéticos.^{38,39} La aplicación de fibroblastos en la dermis ya se ha propuesto como una nueva alternativa terapéutica para atenuar los signos del envejecimiento cronológico o de fotoenvejecimiento.⁴⁰ Sin embargo, no son fáciles de conseguir comercialmente, por lo que su uso clínico se ha visto limitado.⁴¹

TERAPIAS ACTUALES CON FIBROBLASTOS

Los fibroblastos ya se han utilizado en diferentes patologías, solos o en combinación con queratinocitos, como sustitutos dérmicos biológicos⁴², por ejemplo, en el tratamiento de úlceras venosas⁴³. La inyección de fibroblastos autólogos cultivados se ha propuesto para el tratamiento de padecimientos reconstructivos como piel quemada⁴⁴, irradiada⁴⁵, atrofia subcutánea⁴⁶, así como patologías complejas como craneosinostosis, regeneración tendinosa, cierre de defectos pleurales y en ingeniería de ligamento cruzado anterior. Desde el punto de vista estético, se ha propuesto como tratamiento de cicatrices de acné⁴⁷ y en pliegues periorbitarios⁴⁸, y a partir del 2011, fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) como terapia para la atenuación de los pliegues nasolabiales⁴⁹.

INTRUMENTOS DE VALORACIÓN DE ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO

Los signos clínicos de envejecimiento deben ser graduados en una escala que refleje la progresión.⁵⁰ Existen diferentes bioinstrumentos que miden las características de la piel en estados basales y como sistemas de monitorización para terapias celulares.^{51,52,53} Sin embargo, en la práctica clínica son poco utilizados por ser muy costosos (principal inconveniente).

El uso de la fotografía digital combinado con un análisis imagenológico es una herramienta clínica sencilla y útil para cuantificar la mejoría en arrugas y otras condiciones dermatológicas. Lemperle, Holmes y Lempere G. (2001), presentaron un sistema de clasificación para arrugas faciales (de 0 –sin arrugas- a 5 –arruga muy profunda, pliegue redundante -) de 11 regiones faciales diferentes: frente, región glabellar, labio superior, surco labiamental, cuello, líneas preauriculares, mejillas, líneas periorbitarias, pliegues nasolabiales, pliegues de comisuras, líneas de marionetas. Además mostraron una correlación intraclase de 0.80.⁵⁴

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue comparar la disminución de las arrugas faciales con el tratamiento alternativo a base de fibroblastos autólogos cultivados (FAC) en suero autólogo vs solo la aplicación de suero autólogo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo clínico controlado, aleatorizado (doble ciego) con pacientes de la Clínica “Contorno Corporal y Estética Facial”, del servicio de Cirugía Plástica del Hospital “Dr. Manuel Gea González”, que desearon también algún procedimiento no quirúrgico que mejorara la estética facial, principalmente, disminución de arrugas faciales. Se comparó la disminución de las arrugas faciales con el tratamiento alternativo de fibroblastos autólogos cultivados (FAC) en suero autólogo (grupo 1) vs solo la aplicación de suero autólogo (grupo 2).

El cálculo de tamaño de muestra se obtuvo por metodología de comparación de proporciones, con una seguridad del 95% y un poder del 80%, requiriendo 42 pacientes por grupo, tomando los datos publicados por Nilforoushzadeh, Siadat y Nars (2010).⁴⁶ Sin embargo, dado el costo elevado de la intervención, se decidió considerar realizar un análisis *interim* para evaluar la efectividad de la intervención, con 20 pacientes para cada grupo.

Se incluyeron mujeres y hombres de 40 a 60 años, con grados 2 o 3 según la escala de Glogau, que aceptaron participar en el estudio (mediante consentimiento informado).

Se excluyeron aquellos pacientes con alguna de las siguientes características: fumadores, pacientes con enfermedades genéticas hereditarias ligadas a la síntesis de matriz extracelular. ligadas a los fibroblastos, enfermedades de la colágena (Fibromiositis), incluso cicatrización patológica tipo queiloide, datos de hipersensibilidad de contacto o de alguna otra patología del sistema inmune, enfermedades inmunológicas reactivas cutáneas como psoriasis o pénfigo, cáncer, en particular algún linfoma cutáneo o sarcomas de partes blandas, aquellos con alguna enfermedad inmunodepresiva. Si se encontraban en periodos de embarazo o lactancia. Carcinomas basocelular y epidermoide, Diabetes mellitus y/o Hipertensión Arterial Sistémica no controladas o Infecciones cutáneas o sistémicas.

Los criterios de eliminación fueron: que las muestras cutáneas para obtención de fibroblastos hubieran presentado alguna complicación al momento de su procesamiento (falta de crecimiento de fibroblastos o contaminación de la muestra); que los pacientes no se presenten a alguna de sus aplicaciones o acudan de forma inconstante a sus citas mensuales; que no respondieran a llamados o no haberse presentado a los estudios fotográficos o que hubieran deseado en cualquier momento dejar de participar en el estudio.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS:

Se realizó una historia clínica completa y el estudio se dividió en tres fases:

Fase I: Recolección de tejido para cultivo de fibroblastos, el cual consiste en:

- 1) Llenado de consentimiento informado.
- 2) Colecta de aproximadamente 30 cc de sangre en tubos rojos (útiles por no contener algún aditivo o anticoagulante que modifique la sangre y derivados). Dicha muestra se centrifugó posteriormente para obtención de suero, el cual sirvió como vehículo para la aplicación posterior de los fibroblastos.
- 3) Toma de muestra de cultivo de fibroblastos:
 - a. Asepsia y antisepsia con clorhexidina, colocación de campos quirúrgicos en región inguinal izquierda o derecha.
 - b. Aplicación de 1 cc de anestesia local (lidocaína 2% con epinefrina 1:10,000) con jeringa y aguja de insulina. La toma de la muestra cutánea fue sobre pliegue inguinal, con sacabocado desechable de 0.5 cm, de espesor total (a pesar de incluir tejido celular subcutáneo, éste se desechó y sólo se preservó epidermis y dermis).
 - c. Inmediatamente, la muestra cutánea fue depositada en tubo con medio de cultivo RPMI estéril y colocada en refrigeración a 4° para su posterior traslado a la Facultad de Medicina.
 - d. En la zona donante se verificó hemostasia, y debido su tamaño, el cierre primario se realizó con afrontamiento de los bordes cutáneos con tela adhesiva, sin necesidad de aplicación de suturas.

Fase II: Procesamiento de las muestras:

- 4) Ese mismo día, bajo sistema frío, se trasladaron las muestras debidamente identificadas y etiquetadas a la Facultad de Medicina C.U. en el área de Biología Celular y Tisular, para su procesamiento, que en general consistió en:
 - a. Vigilancia de las muestras por 24 horas, para descartar contaminación de las muestras por crecimiento fúngico o bacteriano.
 - b. Aquellos pacientes que fueron asignados al grupo sin intervención (aplicación sólo de suero autólogo): sus muestras cutáneas fueron almacenadas y congeladas para ser procesadas y aplicadas, una vez terminado el ensayo clínico controlado.
 - c. Bajo condiciones estériles y de bioseguridad, con uso de cabina de flujo laminar, las muestras se prepararon para procesos de digestión tisular con dispasa para retirar a la epidermis y colagenasa para obtener a los fibroblastos. Los fibroblastos se colocaron en botellas de 75 cm² y se les añadieron diferentes factores de crecimiento para su activación y cultivo (EFG, FGF)⁵⁵. Después de 1 mes de cultivo en esas condiciones, los fibroblastos fueron cosechados y el número de ellos se ajustó a 15 x10⁶ células por ml de suero autólogo (de cada paciente) para su aplicación intradérmica.
 - d. Este proceso se realizó dos veces más, de tal modo que a cada paciente se le aplicaron 9 mL en 3 meses, es decir, 3 mL cada mes.

Fase III: Aplicación de los fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo o sólo suero autólogo:

- 1) Se delimitaron las zonas de aplicación en la región facial con especial énfasis en las regiones: frontal, glabellar, palpebrales laterales, labio superior, comisuras labiales, mejillas, surcos nasolabiales, nasoyugal (línea marioneta) y labiamental.
- 2) Los fibroblastos fueron suspendidos con suero autólogo obtenido de la muestra sanguínea ya comentada, y listos para su aplicación, en jeringas de insulina etiquetadas y agujas ultradelgadas. Al grupo sin intervención se le aplicó en esta fase sólo suero autólogo. La aplicación fue intradérmica en dermis media, con técnica punto a punto o retrolíneaal, esta última en área de surcos, según lo ameritó el caso.
- 3) Fueron 3 sesiones separadas cada una por 1 mes, donde al total de las 3 sesiones se aplicaron 9 mL, con un total de 135 millones de fibroblastos.
- 4) A los participantes se les tomaron fotografías digitales homogeneizadas (fondo azul, basados en los principios fotográficos para la valoración con la escala de Lemperle, incluyendo que éstas sean sin maquillaje u otro aditamento tópico que pueda modificar su valoración y obviamente, sin modificación de las mismas con algún programa computacional). Dichas fotografías fueron tomadas un día antes de la primera aplicación (basal), y al 2º, 4º y 5º meses posteriores a la aplicación del primer vial. Total 4 sesiones fotográficas. Además, posterior a cada sesión fotográfica, a cada paciente se le realizó una valoración dermatológica dirigida, (siempre por la misma dermatóloga, desconociendo el tipo de tratamiento aplicado a cada paciente), donde se obtuvieron los siguientes datos: Edad, sexo, fototipo según Fitzpatrick, clasificación de Glogau, escala Lemperle (sin clasificar líneas de cuello ni preauriculares). Valoración cutánea de 3 aspectos: firmeza (asignando una clasificación desde 1 - flacidez completa- hasta 5 –muy firme), suavidad (1 –muy dura- hasta 5 –muy suave-), hidratación (1 –piel seca- hasta 5 –muy hidratada-). Finalmente se usó una escala de autosatisfacción cutánea facial antes y después del tratamiento (a 5 meses de la aplicación inicial) en los siguientes rubros: a) disminución de arrugas, b) firmeza, c) suavidad e d) hidratación.
- 5) Dada la naturaleza del diseño del estudio se midió la seguridad de las intervenciones, en donde se midieron los posibles efectos adversos mediante un diario de reporte (mensual) que llenaron todos los pacientes incluidos y que fue entregado en cada cita. Además de que dentro de las valoraciones dermatológicas se preguntó a cada paciente si presentó algún efecto adverso.

En el análisis bivariado se compararon las características clínicas de la piel (arrugas, firmeza, suavidad, hidratación y satisfacción de los pacientes) entre el grupo de intervención y el grupo placebo mediante pruebas exactas de Fisher, y en el grupo de intervención se aplicó además la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon.

Asimismo se reportaron las frecuencias y proporciones de los eventos adversos presentados. Para el procesamiento de la información se elaboró una base de datos en Excel de Microsoft, y el análisis estadístico se realizó con el paquete computacional Statistical Package for the Social Sciences (SPSS22.0).

RESULTADOS

Se incluyeron 40 pacientes, 20 por grupo, con asignación al azar. El promedio de edad para el grupo de intervención fue de 48.1 ± 4.95 años, (min-max 40-a 57 años). El promedio de edad para el grupo sin intervención fue de 51 ± 5.25 años (min-max 41-a 60 años). Se describen el resto de las características demográficas en el cuadro 1:

CUADRO 1: CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)*			GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO)		
Característica	N = 20	%	Característica	N = 20	%
Femenino	18	90	Femenino	20	100
Masculino	2	10			
Fitzpatrick 2	2	10	Fitzpatrick ≤ 2	5	25
Fitzpatrick 3	7	35	Fitzpatrick 3	8	40
Fitzpatrick 4	11	55	Fitzpatrick 4	5	25
			Fitzpatrick 5	2	10
Glogau 2	7	35	Glogau 2	4	20
Glogau 3	13	65	Glogau 3	16	80

- * FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo
- No hubo diferencias estadísticamente significativas en sexo, fototipo Fitzpatrick o escala de Glogau entre los grupos tratados con FAC y aquellos tratados con suero.

El cuadro 2 resume la presencia basal de arrugas por grupo de intervención, en los puntos faciales anatómicos donde posteriormente se realizó la aplicación subcutánea de fibroblastos o de suero.

CUADRO 2: PRESENCIA DE ARRUGAS –BASEALES-

Sitio	GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)*		GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO)	
	N = 20	%	N = 20	%
Frente	12	60	17	85
Glabela	19	95	18	90
Canto derecho	20	100	20	100
Canto izquierdo	20	100	20	100
Labio	9	45	7	35
Comisura derecha	20	100	20	100
Comisura izquierda	20	100	20	100
SNL derecho	20	100	20	100
SNL izquierdo	20	100	20	100
Mejilla derecha	5	25	5	25
Mejilla izquierda	5	25	5	25
Línea Marioneta Derecha	9	45	15	75
Línea Marioneta Izquierda	8	40	18	90
Surco labiomenta	13	65	18	90
Efélides	16	80	18	90
Melasma	13	65	10	50

* FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo SNL= Surco Naso Labial

El cuadro 3 resume cuántos pacientes presentaron o no mejoría, según la valoración dermatológica, acorde al sitio anatómico, desde la medición basal (1ª valoración) en comparación al 5o mes (4ª valoración) posterior a la aplicación subcutánea de fibroblastos o de suero; por ello se aplicó la prueba estadística Exacta de Fisher, ya que el tamaño de la muestra es reducido (menos de 30 pacientes en cada grupo)

CUADRO 3: PRESENCIA DE MEJORÍA DE ARRUGAS –BASALES VS 5º MES-

SITIO ANATÓMICO	GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)* N = 20		GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO) N = 20		**P con IC 95%
	Mejoría	No Mejoría	Mejoría	No Mejoría	
Frente	11	9	2	18	0.005
Glabela	17	3	2	18	<0.0001
Canto derecho	18	2	3	17	<0.001
Canto izquierdo	19	1	2	18	<0.001
Labio	7	13	1	19	<0.05
Comisura derecha	18	2	3	17	<0.001
Comisura izquierda	18	2	3	17	<0.001
SNL derecho	19	1	2	18	<0.0001
SNL izquierdo	19	1	1	19	<0.0001
Mejilla derecha	5	15	0	20	0.02
Mejilla izquierda	5	15	0	20	0.02
Línea Marioneta Derecha	7	13	1	19	0.043
Línea Marioneta Izquierda	7	13	1	19	0.043
Surco labiamental	12	8	1	19	<0.001

* FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo; SNL= Surco Naso Labial

**Prueba Exacta de Fisher

El cuadro 4 resume cuántos pacientes presentaron o no mejoría, según la valoración dermatológica, acorde a características cutáneas, como firmeza, suavidad e hidratación, desde la medición basal (1ª valoración) en comparación al 5o mes (4ª valoración) posterior a la aplicación subcutánea de fibroblastos o de suero; por ello se aplicó la prueba estadística Exacta de Fisher, ya que el tamaño de la muestra es reducido (menos de 30 pacientes en cada grupo)

CUADRO 4: PRESENCIA DE MEJORÍA EN: FIRMEZA, SUAVIDAD E HIDRATACIÓN – VALORACIONES DERMATOLÓGICAS BASALES VS 5º MES-

CARACTERÍSTICA CUTÁNEA EVALUADA	GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)* N = 20		GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO) N = 20		**P con IC 95%
	Mejoría	No Mejoría	Mejoría	No Mejoría	
Firmeza	20	0	9	11	<0.0001
Suavidad	20	0	6	14	<0.0001
Hidratación	19	1	7	13	<0.0001

* FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo

**Prueba Exacta de Fisher

El cuadro 5 resume cuántos pacientes notaron alguna mejoría, como parte de la escala de autosatisfacción, acorde a características cutáneas, como arrugas, firmeza, suavidad hidratación y pigmentación, desde la medición basal (1ª valoración) en comparación al 5o mes (4ª valoración) posterior a la aplicación subcutánea de fibroblastos o de suero. También se aplicó la prueba estadística Exacta de Fisher.

CUADRO 5: PRESENCIA DE MEJORÍA EN: ARRUGAS, FIRMEZA, SUAVIDAD, HIDRATACIÓN Y PIGMENTACIÓN –AUTOSTISFACCIÓN BASAL VS 5º MES-

CARACTERÍSTICA CUTÁNEA EVALUADA	GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)* N = 20		GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO) N = 20		**P con IC 95%
	Mejoría	No Mejoría	Mejoría	No Mejoría	
Arrugas	17	3	12	8	0.093
Firmeza	19	1	6	14	<0.0001
Suavidad	19	1	8	12	<0.0004
Hidratación	20	0	19	1	0.48
Pigmentación	17	3	6	14	<0.0001

* FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo

**Prueba Exacta de Fisher

El cuadro 6 se realizó usando la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon, con la finalidad de determinar si en realidad hubo mejoría (diferencia) entre las valoraciones dermatológicas del grupo de intervención, antes y después del tratamiento.

CUADRO 6: PRUEBA DE RANGOS CON SIGNO DE WILCOXON EN GRUPO INTERVENCIÓN, SEGÚN LAS VALORACIONES DERMATOLÓGICAS –BASALES VS 5º MES-

SITIO ANATÓMICO Y CARACTERÍSTICA	P con IC 95%	SITIO ANATÓMICO Y CARACTERÍSTICA	P con IC 95%
Frente	0.002	Glabela	<0.0001
Canto derecho	<0.001	Canto izquierdo	<0.001
Labio	<0.011	Surco labiomental	0.001
Comisura derecha	<0.0001	Comisura izquierda	<0.0001
SNL derecho	<0.0001	SNL izquierdo	<0.0001
Mejilla derecha	0.025	Mejilla izquierda	0.025
Línea Marioneta Derecha	0.014	Línea Marioneta Izquierda	0.014
Efélides	0.001	Melasma	0.003
Firmeza	<0.0001	Suavidad	<0.0001
Hidratación	<0.0001	SNL= Surco Naso Labial	

El cuadro 7 se realizó usando la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon, con la finalidad de determinar si en realidad hubo mejoría (diferencia) entre la escala de autosatisfacción del paciente, antes y después del tratamiento.

CUADRO 7: PRUEBA DE RANGOS CON SIGNO DE WILCOXON EN EL GRUPO DE INTERVENCIÓN, ACORDE A LA ESCALA DE AUTOSATISFACCIÓN DEL PACIENTE –BASALES VS 5º MES-

CARACTERÍSTICA	**P con IC 95%
Arrugas	<0.0001
Firmeza	<0.0001
Suavidad	<0.0001
Hidratación	0.285
Pigmentación	<0.0001

Finalmente, el cuadro 8 resume los eventos adversos reportados por los pacientes en ambos, básicamente todos fueron catalogados como leves, sin requerir algún medicamento para su resolución. Una paciente en el grupo de no intervención reportó eritema facial transitorio al 10º día, no asociado a fiebre ni alguna zona indurada, se mantuvo en vigilancia, sin embargo no volvió a presentarse. El edema se presentó en el 100% de las pacientes, en ambos grupos, debido al tipo de inyección (dérmica); sin embargo, la resolución del mismo se encontró en transcurso de las siguientes dos horas después de la aplicación. Las áreas equimóticas fueron reportadas principalmente en cantos oculares externos justo al momento de la aplicación de la inyección; dichas áreas se contuvieron con presión local, y su resolución fue dentro de los primeros 5 días.

CUADRO 8: EVENTOS ADVERSOS

Característica	GRUPO INTERVENCIÓN (FAC)*		GRUPO NO INTERVENCIÓN (SUERO)	
	N = 20	%	N = 20	%
**Eritema	0	0	1	5
**Equimosis	3	15	2	10
***Edema	20	100	20	100

* FAC: Fibroblastos Autólogos Cultivados en Suero Autólogo

**En sitios de punción.

*** El 100 % de las pacientes presentó edema del sitio de punción, sin embargo, fue pasajero y resolvió en el transcurso de máximo 2 hrs después de la aplicación

Se presentan las fotos de algunas pacientes de ambos grupos:



Foto 1 Paciente femenino 48 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo) Justo Previo a tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 2 Paciente femenino 48 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo) 5 meses después tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación



Foto 3 Paciente femenino 47 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo) Justo Previo a tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 4 Paciente femenino 47 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo). A 5 meses del tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 5 Paciente femenino 52 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo) Justo Previo a tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación



Foto 6 Paciente femenino 52 años, Grupo no intervención (Sólo suero autólogo). A 5 meses del tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 7 Paciente femenino 44 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). Justo previo a tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 8 Paciente femenino 44 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). A 5 meses del tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 9 Paciente femenino 54 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). Justo previo a tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación



Foto 10 Paciente femenino 54 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). A 5 meses del tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 11 Paciente femenino 56 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). Justo previo al tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.



Foto 12 Paciente femenino 56 años, Grupo intervención (Fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo). A 5 meses del tratamiento. Del archivo fotográfico de esta investigación.

DISCUSIÓN

Los fibroblastos autólogos cultivados son una terapia incluso aprobada por la FDA para la disminución o atenuación de pliegues nasolabiales; en México, esta investigación es la primera en mostrar su eficacia y seguridad como terapia alternativa en la disminución o atenuación, no sólo de dichos pliegues, sino también en el resto de arrugas faciales. Las características demográficas se muestran en el cuadro 1.

Como ya ha sido comentado, y basándose en que no existe un tratamiento convencional para las arrugas faciales, se han utilizado diferentes métodos para la atenuación de arrugas cutáneas, incluyendo la aplicación intradérmica de fibroblastos en combinación con otras sustancias (como ácido hialurónico). A pesar que en nuestro país existen laboratorios que ofrecen la aplicación combinada de ácido hialurónico con fibroblastos autólogos combinados, como terapia de rejuvenecimiento facial, no existía evidencia científica en la población mexicana, ni como terapia única (fibroblastos autólogos cultivados) ni combinada (fibroblastos autólogos cultivados más ácido hialurónico). De ahí la importancia de esta investigación.

En cuanto a la terapia combinada (basándose en interacción mecánica y mediada por receptor de fibroblastos – ácido hialurónico), se desconoce aún si el efecto es por el componente celular o por la acción mecánica del relleno añadido. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran con significancia estadística que no hay necesidad de uso de ácido hialurónico en la terapia de fibroblastos autólogos cultivados, ya que por sí mismos generan una mejoría significativa en la disminución de arrugas faciales (cuadros 3 y 6; fotos 7 a 12). También se observó mejoría significativa en características cutáneas como firmeza, suavidad e hidratación, reflejado en la autopercepción del paciente y en las valoraciones dermatológicas seriadas (Cuadros 4 a 7).

El cálculo de muestra inicialmente se basó considerando los datos reportados por Smith RS y colaboradores (2012)⁵⁶ quienes reportaron en su estudio multicéntrico, que el 75% de los pacientes tratados con fibroblastos autólogos y el 48% de los pacientes con suero mejoraron clínicamente el aspecto de las arrugas en el área nasolabial utilizando escalas clínicas como la que se utilizó en éste proyecto por los evaluadores cegados al tipo de tratamiento. Con la misma metodología de comparación de proporciones, habrían sido necesarios 75 pacientes por grupo, sin embargo, por lo comentado en la sección de materiales y métodos, fue necesario realizar un análisis *interim*, obteniendo resultados estadísticamente significativos, a favor del tratamiento propuesto en esta investigación.

En nuestra metodología inyectamos aproximadamente 135 millones de fibroblastos cultivados por paciente, en un total de 3 sesiones. Autores como Nilfroushzadeh, Siadat y Nars (2010) con el objetivo de describir el porcentaje de atenuación de arrugas en pliegues nasolabiales, inyectaron un total de 40 millones de fibroblastos por paciente (20 pacientes), reportando una mejoría media (atenuación) de dichas arrugas de $41 \pm 13\%$ (mínimo de 20% y máximo 60%).⁴⁶ También usaron suero autólogo para cultivo. Esto es, casi un cuarto de nuestra dosis sería usada sólo para el manejo de los pliegues nasolabiales. Con la cantidad de fibroblastos utilizada en este estudio, suspendida en 9 mililitros de suero autólogo, permitió aplicar adecuadamente y de forma homogénea en múltiples sitios de ritidez facial, para un manejo integral.

Por otra parte, Eça, Pinto, de Pinho, Mazzeti y Odo (2012), mediante un ensayo clínico, con el objetivo de valorar la reparación de piel con datos de envejecimiento facial, aplicaron

fibroblastos autólogos cultivados en suero al 20%, a 5 pacientes de entre 45 y 65 años, en arrugas finas y gruesas (en frente, perioral, nasolabial, mentón y periorbitarias) y lo compararon con 3 pacientes a los que se les administró solución salina amortiguada con fostatos en las mismas zonas. A los 6 meses después de completar el tratamiento. Concluyeron que existe una mejoría significativa en la flacidez cutánea periorbitaria pero sin mostrar mejoría en el resto de líneas de expresión tanto finas como profundas.⁵⁷ La presente investigación se realizó con dos grupos de 20 pacientes cada uno. En ambos grupos se muestra que el uso de suero autólogo como medio de cultivo y como vehículo para la aplicación de fibroblastos autólogos, sólo presentaron reacciones locales mínimas y de duración corta, principalmente eritema, equimosis y edema (Cuadro 8). Aunado a los beneficios de no generar reacciones de hipersensibilidad por rechazo, no favorecer la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas ni la formación de granulomas.⁵⁸ En aquellos pacientes del grupo sin intervención, simplemente no hubo cambios en los parámetros antes medidos (fotos 1 a 6). Se trata entonces de una terapia segura con soporte básico para su uso clínico.⁵⁹

Un dato importante en este estudio es que la aplicación de fibroblastos también disminuyó la presencia de hiperpigmentación facial (efélides, melasma) de forma significativa (cuadros 6 y 7; fotos 7 y 8). Aún falta determinar el mecanismo exacto por el cual una célula dérmica como es el fibroblasto, pueda interactuar con una epidérmica, como el melanocito, para regular la sobreproducción de melanina y/o mejorar su microambiente.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio de este tipo en población mexicana que demuestra que los fibroblastos autólogos cultivados en suero autólogo son una alternativa excelente y segura en el manejo de arrugas faciales, por sus efectos duraderos calculados a casi 6 años, aunado a la mejoría de características cutáneas como hidratación, firmeza, suavidad e hiperpigmentación. El cultivar células autólogas en un medio también autólogo (suero) y su posterior aplicación dérmica con el objetivo de que los fibroblastos generen proteínas de matriz extracelular *in situ*, en lugar de aplicar solamente proteínas de matriz extracelular, es una mejor opción para atenuar los signos del envejecimiento cutáneo como las arrugas y líneas de expresión.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo fue aprobado por los comités de Investigación y Ética en Investigación, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, bajo el número **05-62-2015**. Todos los pacientes participaron bajo consentimiento informado y firmado, el cual también fue aceptado por dichos comités. Este estudio se ajustó a lo estipulado en las Buenas Prácticas Clínicas y sus principios que tienen sus orígenes en la Declaración de Helsinki (Seoul, Korea, 2008). También sigue con las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud, Título Quinto “Investigación para la Salud”, Capítulo Único, artículo 100, fracción IV. Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo “De los Aspectos Éticos de la investigación en Seres Humanos” Capítulo I, Disposiciones Comunes:

- Artículo 13, que señala que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.
- Artículos 14 fracción V, 20, 21 y 22 de dicho Reglamento
- Artículo 17, fracción III: Se considera ésta una Investigación con riesgo mayor que el mínimo, ya que incluye procedimientos quirúrgicos y control con placebos.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Griffiths CE, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med*. 1993; 329:530-535.
- ² Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*, Springer-Verlag Berlin 2005 pp 29-51.
- ³ Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*, Springer-Verlag Berlin 2005 pp 17-28.
- ⁴ Hann A, Chien AL, Kang S. Photoaging, *Dermatol Clin* 32 (2014) 291–299.
- ⁵ Draelos, Z, *Cosmetic Dermatology, Products and Procedures*, Blackwell Publishing, 2010 pp 31- 36.
- ⁶ Hann A, Chien AL, Kang S. Photoaging, *Dermatol Clin* 32 (2014) 291–299.
- ⁷ Draelos, Z, *Cosmetic Dermatology, Products and Procedures*, Blackwell Publishing, 2010 pp 31- 36.
- ⁸ Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*, Springer-Verlag Berlin 2005 pp 1-19.
- ⁹ West TN, Alster TS. Autologous Human Collagen and Dermal Fibroblasts for Soft Tissue Augmentation. *Dermatologic Surgery, Inc. Dermatol Surg* 1998;24:510-512
- ¹⁰ Wollina U, Goldman A. Dermal fillers: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*.2013, 31;731–736.
- ¹¹ De Maio M, Rzany B. *Injectable Fillers in Aesthetic Medicine*. Springer, 2006.pp 1-9.
- ¹² GlogauRG, *Fillers: From the Past to the Future*. 2012, *Semin Cutan Med Surg* 31:78-87.
- ¹³ Truong D, Dressler D, Hallett M, Pathak M, *Manual of Botulinum toxin Therapy*. Cambridge University Press, 2009 pp 133-142.
- ¹⁴ Migliano E, Bellei B, Govoni FA, Bucher S, Picardo M. Fat and epidermal cell suspension grafting: a new advanced one-step skin regeneration surgical technique. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014 Feb 24; 33:23.
- ¹⁵ Wollina U. Midfacial rejuvenation by hyaluronic acid fillers and subcutaneous adipose tissue – A new concept. *Med Hypotheses* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.023>.
- ¹⁶ Bassetto F, Turra G, Salmanso R, Lanerotto L, Del Vecchio DA. Autologous Injectable Dermis: A Clinical and Histological Study. *Plast.Reconstr.Surg*.2013. 131: 589e.
- ¹⁷ Goldberg DJ. *Facial Resurfacing*. Wiley-Blackwell, 2010 pp 99-119.
- ¹⁸ Rabello-Fonseca RM, AzulayDR, Luiz RR, Mandarin-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.
- ¹⁹ Kim DH, Je YJ, Kim CD, Lee YH, SeoYJ, Lee JH, Lee Y. Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol*. 2011 Nov;23(4):424-31.
- ²⁰ Matarasso SL, Carruthers JD, Jewell ML. Consensus recommendations for soft tissue augmentation with non-animal stabilized hyaluronic acid (Restylane). *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117:3S-34S.
- ²¹ Weindl G, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004; 17:207-213.
- ²² Fagien S, Cassuto D. Reconstituted Injectable Hyaluronic Acid: Expanded Applications in Facial Aesthetics and Additional Thoughts on the Mechanism of Action in Cosmetic Medicine. *Plast Reconstr Surg* 2012,130:208.
- ²³ Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2003; 27:354-366.
- ²⁴ Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem*. 2002; 277:4585-4588.

-
- ²⁵ Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, et al. In Vivo Stimulation of De Novo Collagen Production Caused by Cross-linked Hyaluronic Acid Dermal Filler Injections in Photodamaged Human Skin, *Arch Dermatol*. 2007;143:155-163.
- ²⁶ Langer R, *Tissue Engineering*. *Molecular Therapy* 2000; 1:1
- ²⁷ Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Shcenke-Layland K. Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*.2011; 128, 352–366.
- ²⁸ Sterodimas A, De Faria J, Correa W, Pitanguy I. Tissue Engineering in Plastic Surgery An Up-to-Date Review of the Current Literature. *Ann Plast Surg*2009;62: 97–103.
- ²⁹ Lu G, Huang S. Bioengineered skin substitutes: key elements and novel design for biomedical applications. *Int Wound J* 2012; 10.1111.
- ³⁰ Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kaiho E, Kitahara T, Takema Y, Tsubol R. An in vivo mouse model of human skin substitute containing spontaneously sorted melanocytes demonstrates physiological changes after UVB irradiation. *J Invest Dermatol*. 2005; 125:364 –372.
- ³¹ López GJ, García LI, Rivas L, Martínez GJ, Use of Autologous Serum in ophthalmic practice. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82:9-20.
- ³² Parapar TS, Gil BN, Ariocha CA, Cueto SD, Pérez MM, Application of 100% autologous serum in scleromalacia perfortans. *Rev. Mex. Oftalmol*. 2011; 85(2):103-106.
- ³³ Majid I, Shah S, Hassan A, Aleem S, Aziz K, How Effective is Autologous Serum Therapy in Chronic Autoimmune Urticaria, *Indian J Dermatol*. 2015; 60(1): 102.
- ³⁴ Lagnado R, King AJ, Donald F, Dua HS.A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 464-465.
- ³⁵ Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kaiho E, Kitahara T, Takema Y, Tsubol R. An in vivo mouse model of human skin substitute containing spontaneously sorted melanocytes demonstrates physiological changes after UVB irradiation. *J Invest Dermatol*. 2005; 125:364 –372.
- ³⁶ Thangapazham RJ, Darling TN, Meyerle J. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci*. 2014, 15, 8407-8427
- ³⁷ Castro JR. Obtención de Rellenos subérmicos a partir de ácido hialurónico y fibroblastos en Ratas Winstar, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. 2012. Tesis.
- ³⁸ Auger F, Berthod F, Moilin V, Pouliot R, Germain L, Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructo in vivo applications, *Biotechnol. Appl. Biochem*. (2004) 39, 263–275
- ³⁹ Wong V, Rustard K, Longaker M, Gurtner G. Tissue Engineering in Plastic Surgery: A Review, *Plast. Reconstr. Surg*.2010, 126: 858.
- ⁴⁰ Rabe JH, Mamelak AJ, Mc Elgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair, *J Am Acad Dermatol*. 2006; 55(1):1-19.
- ⁴¹ Sterodimas A, De Faria J, Correa W, Pitanguy I. Tissue Engineering in Plastic Surgery An Up-to-Date Review of the Current Literature. *Ann Plast Surg* 2009;62: 97–103.
- ⁴² Zhang X, Deng Z, Wang H, Yang Z, Guo W, Li Y, Ma D, Yu C, Zhang Y, Jin Y. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. *Biomaterials*. 2009 May;30(14):2666-74.
- ⁴³ Reyes MG, Herrera EM, Álvarez PJ. Effectiveness Of A Biological Skin Dressing In The Treatment Of Venous Ulcers. UNAM, Departamento de Dermatología, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. 2012. Tesis.
- ⁴⁴ Karchilaki I, Topakas G, Castana O, Sotiriou P, Michelakis D, Alexakis D, Giokas CS. The use of cultured autologous fibroblasts in burn wounds healing process. *Burns*. 2007 Sep;33(6):791-2.

-
- ⁴⁵ Ferguson PC, Boynton EL, Wunder JS, Hill RP, O'Sullivan B, Sandhu JS, Bell RS. Intra-dermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. *J Surg Res.* 1999 Aug;85(2):331-8.
- ⁴⁶ Nilforoushzadeh MA, Esfahani MH, Fesharaki MA, Siadat AH, Ansari N, Baradaran EH. Treatment of atrophic cutaneous leishmaniasis scar using autologous fibroblasts and keratinocytes (a case report and literature review). *J Res Med Sci.* 2010 Mar;15(2):125-6.
- ⁴⁷ Munavalli GS, Smith S, Maslowski JM, Weiss RA. Successful treatment of depressed, distensible acne scars using autologous fibroblasts: a multi-site, prospective, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Dermatol Surg.* 2013 Aug;39(8):1226-36
- ⁴⁸ Thangapazham RJ, Darling TN, Meyerle J. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 8407-8427
- ⁴⁹ Schmidt C, FDA approves first cell therapy for wrinkle-free visage, *Nature Biotechnology.* 2011, 29:8
- ⁵⁰ Glogau RG, Physiologic and structural Changes Associated with Aging Skin. *Dermatologic Clinics,* 1997. 15(4): 555-559.
- ⁵¹ Draelos Z. *Cosmetic Dermatology, Products and Procedures,* Blackwell Publishing Ltd, 2010 pp 47- 54.
- ⁵² Zhuo S, Chen J, Cao N, Jiang X, Xie S, Xiong S. Imaging collagen remodeling and sensing transplanted autologous fibroblast metabolism in mouse dermis using multimode nonlinear optical imaging. *Phys Med Biol.* 2008 Jun 21;53(12):3317-25
- ⁵³ Kim JE, Lee OS, Choi J, Son SW, Oh CH. The efficacy of stereoimage optical topometry to evaluate depressed acne scar treatment using cultured autologous fibroblast injection. *Dermatol Surg.* 2011 Sep;37(9):1304-13
- ⁵⁴ Lemperle G, Holmes RE, Lemperle SM. A Classification of Facial Wrinkles, *Plast Reconstr Surg* 2001, 108 (6):1735-1750.
- ⁵⁵ Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P, Sark HJ. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *European Journal of Cell Biology.* 2007. 86 731–746.
- ⁵⁶ Smith SR, et al. A Multicenter, Double-Blind, Placebo-controlled Trial of Autologous Fibroblast Therapy for Treatment of Nasolabial Fold Wrinkles. *Dermatol Surg* 2012;38:1234–1243.
- ⁵⁷ Eça LP, Pinto DG, de Pinho AM, Mazzetti MP, Odo ME. Autologous Fibroblast Culture in the Repair of Aging Skin. *Dermatol Surg* 2012;38:180–184
- ⁵⁸ Weiss RA. Autologous cell therapy: will it replace dermal fillers? Review. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2013 May;21(2):299-304.
- ⁵⁹ Zeng W, Zhang S, Liu D, Chai M, Wang J, Zhao Y. Preclinical safety studies on autologous cultured human skin fibroblast transplantation. *Cell Transplant.* 2014 Jan;23(1):39-49.