

INFORME DE BIOSEGURIDAD INMUNOLÓGICA DE BIOIMPLANTES: ACIDO HIALURÓNICO.

Dra. María Guadalupe Ercilla González

Especialista en Hematología y Hemoterapia e Inmunología
Medico Consultor Senior. Servicio de Inmunología. CDB
Hospital Clínico de Barcelona.

Profesionalmente paso del área de la Hematología a Inmunología, a través del estudio del polimorfismo de las moléculas HLA en el trasplante de médula ósea y por extensión al de los órganos sólidos.

Tras una estancia en el Hospital Saint Louis de Paris, en el laboratorio del Prof. Jean Dausset (cuyo descubrimiento del sistema HLA (*Human Leucocyte Antigens*), le supuso ser galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1980, compartido con Baruj Benacerraf y George Davis Snell) se integro a la Unidad de Inmunología del Hospital Clínico de Barcelona, donde continua realizando su actividad profesional.

Su interés científico se ha focalizado fundamentalmente en el estudio del polimorfismo de las moléculas HLA y los procesos de alorreactividad, tolerancia inmunologica y autoinmunidad.

Ha publicado más de 100 trabajos en revistas indexadas en Pubmed en el área de la asociación de moléculas HLA con la susceptibilidad a enfermedades, la respuesta frente a infecciones y a cambios postraduccionales de proteínas dianas en la respuesta inmunitaria

Declaración

La autora de este informe declara no tener conflicto de intereses con ninguna firma comercial ni institución relacionada con la administración de bioimplantes cutáneos.

Abreviaturas

AH: Acido hialurónico; MEC: Matriz Extracelular; RI Respuesta inmunitaria; APC: Célula Presentadora de antígeno.

BIOSEGURIDAD Y EFECTOS ADVERSOS DE LOS RELLENOS CON ACIDO HIALURÓNICO.

La modelación cosmética de los tejidos blandos con fines reparadores o solamente estéticos ha experimentado una gran demanda en los últimos años, ello ha estimulado el desarrollo de una gran variedad de materiales para estos fines. Estos biomateriales deben ser farmacológicamente inertes, no inmunogénicos, y no tener efectos mutagénicos.

En función de su biodegradabilidad se pueden clasificar en implantes reabsorbibles, que son biodegradables y de duración limitada (8-12 meses) como el colágeno y el Acido Hialurónico, e implantes irreabsorbibles, cuya duración es permanente, entre los que se encuentran las acrilamidas, metacrilato, poliaquilimidas y siliconas.

Dentro del grupo de materiales biodegradables se incluyen aquellos que se encuentran en forma natural en el organismo, como colágeno o acido hialurónico (Hyaluronan).

El colágeno, se obtiene habitualmente de fuentes animales (bovino, humano), aunque considerado en una época como el "producto de oro", el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad en un porcentaje significativo (Cooperman LS. *Aesthetic Plast Surg* 1985; 9: 145), hizo recomendable la realización de un test cutáneo previo a su administración, restringiendo además sus indicaciones. Diversos preparados desarrollados posteriormente han reducido la frecuencia de estas reacciones alérgicas, sin embargo es difícil descartar cualquier riesgo ya que el colágeno es un producto muy empleado, especialmente en cosméticos.

Una alternativa es el ácido hialurónico (AH) que ha sido empleado sin problemas en diversas especialidades medicas entre ellas oftalmología y ortopedia durante años con fines reparadores (Steinsapir KD *Ophtalmic Plast Reconstruc Surg* 2006; 22:344; Petrella RJ *Clin J Sport* 2007; 17:251).

La mayor parte de los bioimplantes que se utilizan en medicina estética son de acido hialurónico, por lo que se centra este informe sobre este material.

ACIDO HIALURÓNICO

El acido hialurónico es un polisacárido esencial que forma parte de la matriz extracelular (MEC) y se encuentra abundantemente en el cordón umbilical, articulaciones y en el humor vítreo del ojo (Kogan G *Biotechnol Lett* 2007; 29:17). Es sintetizado predominantemente por las células mesenquimales y es el único entre la familia de los glicosaminoglicanos que no esta unido covalentemente a proteínas, ni contiene azufre. Consiste en unidades repetitivas de Ac D-glucurónico y N-acetilglucosamina.

El AH nativo existe como un polímero de alto peso molecular y se une a proteoglicanos para proporcionar la integridad a los tejidos y forma una matriz para la migración celular. El AH también se ha encontrado en zonas de inflamación, angiogénesis y cicatrización en forma preferente de polímeros de menor tamaño (Mc Kee C J Clin Invest 1996; 98:2403). Es por lo tanto importante conocer el tamaño del AH para interpretar su funcionalidad.

El AH tiene un rápido recambio en el tejido de los mamíferos (5g/día en el hombre) cuya eliminación depende, en parte, del drenaje linfático y de un receptor tipo scavenger (HARE) para su degradación por las células endoteliales. A nivel celular hay un equilibrio entre la producción de AH por sintetasas específicas y su destrucción por hialuronidasas (Harada H J Biol Chem 2007; 282:5597).

Para su uso en medicina, el AH puede obtenerse a partir de crestas de gallos, aletas de tiburón o producido por fermentación bacteriana de cepas no patógenas para humanos (*Streptococcus equii*, *Streptococcus zooepidemicus*).

El AH no es especie específico, es decir no varía su composición entre especies, por lo que los estudios de hipersensibilidad efectuados, independientemente de su origen, no muestran reactividad cutánea. En la actualidad, es uno de los materiales más seguros para tratamientos estéticos, especialmente faciales. Sin embargo, tiene el inconveniente de que su efecto es temporal precisando inoculaciones repetidas, para mantener el efecto estético deseado.

Para retrasar el tiempo de reabsorción del AH, aumentar su viscosidad y estabilidad los preparados utilizados en reparación estética, además del AH contienen un agente polimerizante (BDDE: 1,4 butandiol digliceriléter, o DVS:Divinilsulfona) y a veces se incluye en el preparado un anestésico local como Lidocaína.

Recientemente se ha introducido una variedad de AH conocida como NASHA (Acrónimo de No Animal Stabilized Hyaluronic Acid) para sustituir la polimerización química. Esta estabilización del AH se obtiene generando puentes de carbono cada 2-500 unidades de disacáridos conteniendo cada cadena final aproximadamente unas 100.000 unidades.

Puesto que el AH es un material inerte, algunas de las reacciones adversas observadas, se podrían atribuir a los cambios estructurales del AH polimerizado, a los agentes polimerizantes, anestésicos locales, o restos de proteínas animales, especialmente en el AH obtenido de aves

REACCIONES ADVERSAS DE LOS BIOIMPLANTES ESTÉTICOS CON AH

Teniendo en cuenta que no existe procedimiento médico totalmente desprovisto de riesgos, los diversos ensayos clínicos avalan el uso del AH como uno de los componentes más seguros utilizados en el relleno dérmico. Sin embargo, su inoculación no deja de ser una agresión al organismo, pudiendo producirse reacciones cutáneas (molestias, enrojecimiento e inflamación de la zona

inoculada) que se autolimitan o desaparecen después de un tratamiento antiinflamatorio (Alam Plast Reconstr Surg 2007; 120:98S)

En la literatura se reportan retrospectivamente casos de pacientes con reacciones adversas a diferentes materiales de relleno usados para reparación estética. En ocasiones, se incluyen en el mismo estudio productos cuya composición es diversa en cuanto a biodegradabilidad, tamaño de las partículas, otros aditivos como polimerizantes o anestésicos locales etc. por lo que **es difícil establecer el papel intrínseco del componente de relleno en el desarrollo de la reacción no deseada. Además, la frecuencia con que se reproducen estas reacciones es difícil de calcular porque no existen registros de personas sometidas a estos tratamientos. Algunos trabajos estiman la frecuencia de estas reacciones a partir del número de jeringas vendidas y el promedio de inoculaciones por paciente, calculando el 0,6% las reacciones adversas reportadas antes de 1999 que desciende a 0,2% después de 2000, descenso que coincide con una reducción de contaminantes proteicos en un preparado de AH.** (Friedman Dermatol Surg 2002; 28:491).

Por otra parte, habría que distinguir las reacciones inflamatorias inmediatas que se producen como consecuencia de la agresión física de la inoculación, de aquellas tardías en que podría intervenir una respuesta inmunitaria específica.

Las reacciones cutáneas que se producen horas después de la inoculación del biorelleno, se pueden interpretar como una respuesta inespecífica en que se activa la respuesta innata, como sucede en otros traumatismos o lesiones espontáneas de la piel.

La frecuencia con que se producen estas reacciones pueden estar relacionadas con la técnica de inyección (fanning vs linear threading vs multiple punctions), profundidad y rapidez en la inoculación (Dover JS Surg Dermatol 2009; 35:322) y no son atribuibles al material inoculado. En la mayoría de series publicadas, este tipo de reacciones se resuelven espontáneamente o con tratamiento esteroideo local (Shafir Plast Reconst Surg 2000; 106:1215; Andre JEDV 2004; 18:442).

El desarrollo excepcional de necrosis en zonas especialmente sensibles (glabella, labios) ha sido atribuido a un efecto de compresión vascular que impide la correcta irrigación de la zona o al uso de epinefrina como anestésico que puede producir un espasmo vascular. Más excepcional es el desarrollo de equimosis debido a la perforación de vasos sanguíneos subcutáneos o embolias por inoculación directa del producto en los vasos. En ambos casos se podrían considerar errores accidentales de la praxis. (Narins Dermatol Surg 2006; 32:426, Dover JS Dermatol Surg 2009; 35:322)

En algunos pacientes se ha reportado, de forma tardía el desarrollo de una reacción inflamatoria y la formación de granulomas con características histológicas de una reacción a cuerpos extraños. La formación de granulomas se desencadena como respuesta a antígenos persistentes, sustancias irritantes y en general a compuestos poco solubles. **En ocasiones los granulomas no tienen su origen en una respuesta inmunológica sino que aparecen alrededor de materiales insolubles o de cuerpos extraños difíciles de digerir.**

En muchos casos, en los granulomas formados en la zona de inoculación se ha podido comprobar la presencia de una infección asociada. (Christensen, *Aesthetic Plast Surg* 2005; 29:34; Gomez de la Fuente *Act Dermatosifiliograf* 2007; 98:271; Pacine *Ital J Anat Embriol* 2002; 107:202; Friedman *Dermatol Surg* 2002; 28:491)

En otros casos la evidencia de infección ha sido indirecta ya que se han resuelto mediante post tratamiento antibiótico (*Dover Dermatol Surg* 2009; 35:322). Alguna serie que nunca ha reportado granulomas ha efectuado siempre la manipulación bajo cobertura antibiótica (Burchard AE Ellis *DAF. Facial Plastic Surg* 2009; 25:129)

El origen de la infección, generalmente por bacterias oportunistas es difícil de identificar. Se han sugerido fallos en la manipulación del material (poco probables en jeringas preparadas con el material), contaminantes en los cosméticos usados por las pacientes e incluso en el hielo utilizado para reducir el dolor después de la inoculación.

Es importante reseñar, que en todos los estudios de las reacciones adversas a bioimplantes no se ha considerado la eventualidad de otros productos como responsables de las reacciones alérgicas, ya que los anestésicos locales usados ampliamente en medicina, son considerados seguros. Sin embargo, recientemente se están reportando casos de reacción de hipersensibilidad cutánea a Lidocaina y anestésicos similares, llegando a un 2% de casos de reacciones alérgicas de tipo IV o retardadas (*Mackley Arch Dermatol* 2003; 139:343)

Hasta la actualidad no se ha descrito una relación causa efecto entre la administración de un bioimplante cutáneo y el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Contrariamente, podría suceder en algunos casos reportados que la patología subyacente se haya diagnosticado con motivo de un estudio mas profundo de una reacción adversa, al incluir determinación de marcadores de patología autoinmune (Alijotas-Reig *JEADV* 2008; 22:150).

SE PUEDEN PREDECIR LAS REACCIONES ALÉRGICAS?

Alergia es un estado de hipersensibilidad provocado por la sensibilización del organismo contra un antígeno o alergen concreto. Se precisa un contacto previo con el alergen para que una nueva exposición al mismo provoque una respuesta inmunitaria con producción de anticuerpos o activación de células T.

Clásicamente las reacciones de hipersensibilidad inmediata se caracterizan por la producción de anticuerpos IgE, mientras que en las reacciones de hipersensibilidad tipo IV o retardada las responsables son las células.

La hipersensibilidad retardada se puede valorar mediante tests de inoculación intradérmica, sin embargo esta prueba debe limitarse a las presentaciones biodegradables, que se reabsorben.

Aunque son escasos los estudios que evalúen la hipersensibilidad en pacientes tratados con AH, en un estudio prospectivo de 433 pacientes, inoculados con NASHA no se pudo evidenciar reactividad en los test cutáneos en ningún caso. Para las determinaciones de anticuerpos IgE e IgG anti NASHA los autores optimizaron su desarrollo. En dicho estudio no se detectó la presencia de IgE anti-NASHA en los pacientes antes ni después del tratamiento. En un 7% de pacientes se detectó la presencia de anticuerpos IgG anti-NASHA antes de la inoculación, cuyos títulos permanecieron constantes durante el tratamiento, por lo que los autores lo atribuyen a una infección previa por estreptococo (Hamilton RG Dermatol Surg 2007; 33:S176). Micheels, en un estudio anterior, había reportado ocho pacientes con reacciones adversas; de los cuales uno presentó reactividad intradérmica positiva y otro anticuerpos IgE anti AH (Micheels P Dermatol Surg 2001; 27:185).

La evaluación de estos resultados es difícil de interpretar ya que no existe un método/protocolo estandarizado para evaluar las reacciones cutáneas ni la presencia de IgE específico anti AH. En una carta al editor el Dr. Klein (Klein AW, Dermatol surg 2004; 30:1071) menciona la rectificación de una publicación del Dr. Lowe (Lowe NJ J AM Acad Dermatol 2001:45:197) relativo a la implicación de una respuesta inmunológica en algunas reacciones frente al AH.

En resumen, los resultados reportados tanto en la literatura como en los trabajos citados anteriormente, son discrepantes: en unos casos las pruebas cutáneas han sido negativas (Patel VJ Plast Reconstr Surg 2006; 17: 92e), en otros positivas (Lupton J Dermatol surg 2000; 26:135); y en otros, los resultados no han sido coincidentes en los pacientes (Micheels P Dermatol surg 2001;21: 185),

En la actualidad se desconocen los factores individuales predisponentes a una reacción alérgica. En algunas series de pacientes con alergia a pólenes comprobada por la presencia de IgE específica se ha descrito una mayor frecuencia de algunos alelos del sistema HLA de clase II, aunque no se cumple con valor predictivo. Esta susceptibilidad depende del alérgeno y de las características étnicas de la población.

Las moléculas HLA clase I y clase II intervienen en la respuesta inmunitaria proporcionando la especificidad de la misma. Las moléculas de patógenos captadas desde el exterior de las células presentadoras (APC: macrófagos, células dendríticas), son procesadas en el interior de la célula y las proteínas fragmentadas en péptidos. Estos péptidos son cargados en las moléculas HLA de clase II, si el polimorfismo de estas moléculas tiene una secuencia determinada capaz de interactuar con el péptido. Las moléculas de clase I, son capaces de procesar las proteínas originadas en el interior de las células, como pueden ser las procedentes de virus y parásitos intracelulares. Estas proteínas también son procesadas para formar péptidos que se unen a moléculas de clase I para ser expresadas en la membrana celular de las APC.

Los péptidos cargados en las moléculas HLA permiten la interacción con los receptores de las células T, que son activadas para ejercer su función efectora (liberación de citocinas, activación de células B, efecto citotóxico).

Este tipo de presentación sólo está descrita para secuencias peptídicas, que son presentadas y reconocidas por las células T a través de su receptor específico TCR, que dependiendo de las interleucinas del medio se polariza hacia un tipo

de respuesta inmunitaria efectora (tipo I o tipo II). **El AH es un material aprotéico, por lo que en la RI no participarían las moléculas HLA.**

La respuesta específica T dependiente es regulada por la intensidad de la respuesta innata, que a su vez participa en la regulación de la misma. Otros polimorfismos, además de HLA, en otros genes podrían también estar implicados en la respuesta específica, controlando la intensidad y regulación de la respuesta inmunitaria, pero **no existen evidencias para predecir genéticamente el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad específica.**

Además de la idiosincrasia del paciente en las reacciones alérgicas es importante valorar su historia previa, ya que existen alérgenos de reacción cruzada, que podrán determinar el tipo de respuesta.

FUNDAMENTOS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA (RI)

La primera línea de defensa de la Sistema inmunitario ante las agresiones es la correspondiente a la Inmunidad innata. Diversos receptores, expresados en las células presentadoras de antígeno (CPA) reciben señales inespecíficas de agresión por patógenos denominadas genéricamente PAMPs (Patogen Associated Molecule Patterns) y por lesiones no infecciosas DAMPs (Damage Associated Molecule Patterns) como puede ser hipoxia o lesiones celulares físicas o químicas.

Los receptores celulares de la RI innata más conocidos son los TLR (acrónimo de Toll Like Receptor). En el hombre se han descrito 10 TLR, habiéndose identificado, para algunos, sus ligandos correspondientes y vías de señalización intracelular. (Erridge J Leuk Biol 2010; 87:989)

Los TLR son receptores que reconocen estructuras o motivos altamente conservados en microbios incluyendo virus, bacterias, hongos y protozoos, referidos como PAMP. También pueden unirse a moléculas autólogas tales como HSP (Heat shock proteins), productos de la matriz extracelular como AH, dominios de tipo III de fibronectina, cristales de ácido úrico, y otros liberados como consecuencia de una agresión no infecciosa.

Los TLR están expresados en células endoteliales y epiteliales y representan la primera línea de defensa de la piel (incluyendo el endotelio vascular y queratinocitos). Algunos de estos receptores reconocen polisacáridos de las envolturas bacterianas (por ejemplo TLR4 reconoce LPS de las bacterias gram negativas, TLR2 otros lipopéptidos bacterianos)

La señalización vía TLR ha sido descrita como una importante vía mediadora de la respuesta inflamatoria inducida por AH, especialmente en los modelos de lesión-reparación (Noble PW Proc Am Thorac Soc 2006; 3:401). Para el estudio de la interacción AH con TLR se han utilizado modelos murinos deplecionados de TLR2, TLR4 o ambos en comparación con la cepa íntegra. En estos estudios, se ha descrito que fragmentos de AH (fAH) son capaces de estimular la maduración

de células dendríticas, incrementando la expresión en membrana de CD40, CD86 y CCR7, así como la producción de TNF-alfa, siendo necesaria la presencia de TLR4 para que se produzca esta activación. Esta activación no se produce cuando se utiliza como activador AH de alto peso molecular (Tesar BM J AM Transplant 2006; 6:2622). Además las células dendríticas activadas por AH, vía TLR4 en sinergia con TLR2 pueden promover una respuesta TH2 en las células T.

Los queratinocitos de la epidermis tienen un importante papel estructural formando una barrera física para la entrada de microorganismos patógenos o elementos extraños en el organismo, pero además tienen receptores que pueden ser activados para la secreción de factores solubles con actividad antibacteriana (Braff MH Curr Top Microbiol 2006; 306:91).

Una lesión tisular induce la degradación de la MEC con liberación de AH (Donnarumma G Arch Dermatol Res 2004; 295:474). El AH de alto PM es inerte, pero puede ser degradado y los fragmentos de pequeño tamaño activar los queratinocitos a través de receptores tipo TLR. En estudios *in vitro* con queratinocitos humanos se ha observado que solamente los compuestos de AH de pequeño tamaño son capaces de activar los queratinocitos para la producción de sustancias solubles antimicrobianas como la Defensina 2 a través de TLR2 y TLR4, aunque no son capaces de producir IL-8, TNF-alfa, IL-1b ni IL-6 (Gariboldi S J Immunol 2010;181:2103). **Si extrapolamos estos resultados a la acción del AH inoculado en los bioimplantes, se podría concluir, que al igual que en el modelo murino, el AH de alto PM no es capaz de promover la síntesis de interleucinas proinflamatorias.**

La mayoría de células del organismo incluyendo células dendríticas, monocitos, macrófagos, células endoteliales, linfocitos T, expresan, en estado de reposo el receptor CD44 (molécula de adhesión), cuyos ligandos naturales son proteínas de la matriz extracelular, uniéndose preferentemente al AH.

La interacción de AH de pequeño tamaño con CD44 podría proporcionar señales de alerta para reclutar células T en la región de la lesión. CD44 también podría actuar reparando el tejido lesionado eliminando el AH fragmentado. Sin embargo AH de gran tamaño al unirse con CD44 podría estimular la actividad de las células reguladoras para controlar la respuesta (Bollyky PL J Immunol 2007; 179:744) y tener un efecto negativo en la RI.

CONCLUSIONES

La prevalencia real de los efectos adversos de los implantes cutáneos es difícil de conocer, por cuanto no existe un registro de todas la intervenciones que se realizan en medios médicos.

En la literatura médica se han reportado los casos más graves de reacciones adversas, la mayoría de las cuales han revertido espontáneamente o con tratamiento, habiéndose detectado factores adyuvantes (infecciones) en su desarrollo, pero sin tener en cuenta el efecto de otros posibles factores asociados como el uso de otras sustancias posiblemente alergénicas (anestésicos locales).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la práctica de implantes es la introducción de un elemento extraño en el organismo, contra el cual se puede desarrollar una respuesta inmunitaria inmediata o innata, que se autolimita si no hay factores adyuvantes, pero que puede progresar de forma solapada para manifestarse tardíamente y desarrollar una RI específica (granulomas). Uno de estos factores es la presencia de una infección solapada, demostrada en la mayoría de casos en que se ha investigado su presencia.

Los estudios en modelos murinos con AH nativo muestran que no hay activación de la respuesta innata a través de TLR, pero que fragmentos de AH (AHf) pueden activar células presentadoras de antígeno. Aunque no hay datos en humanos, los preparados de AH son polímeros de mayor tamaño por lo que de forma similar no serían capaces de inducir una activación por esta vía.

En los implantes dérmicos, dado que se inocular solamente material no proteico (en ausencia de infecciones), en la respuesta inmunitaria no interviene la clásica presentación peptídica por moléculas HLA a las células T y la generación de una respuesta T o B con memoria específica. No existiendo en la actualidad datos acerca de una susceptibilidad identificable por un estudio genético que permita predecir la hiperreactividad frente al Acido Hialurónico.

Las reacciones adversas descritas con el uso del AH y relacionadas con los procedimientos de inoculación serían extrapolables a otros bioimplantes, como la reacción inflamatoria local. Sin embargo, se deben tener en cuenta las características de otros biomateriales, en relación a su composición, método de inoculación y tiempo de permanencia que pueden comportarse de manera distinta en el organismo.

BIBLIOGRAFIA

Cooperman LS, Mackinnou V, Bechler G, Pharris BB. Injectable collagen: a six year clinical investigations *Aesthetic Plast Surg* 1985; 9: 145

Steinsapir KD, Steinsapir SMG, Deep-fill Hyaluronic acid for the temporary treatment of rhinogal groove; A report of 303 consecutive treatments. *Ophthalmic Plastic Reconstr Surg* 2006; 22:344

Petrella RJ, Petrella MJ, Cagliano A. Periarticular Hyaluronic Acid in Acute ankle sprain. *Clin J Sport* 2007;17:251

Kogan G, Soltes L, Stern R et al Hyaluronic Acid; a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 2007; 29:17

McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 1996;98:2403

Harada H, Takahashi M, CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase 1 and 2. *J Biol Chem* 2007: 282: 5597

Alam M, Dover JS. Management of complications and sequelae with temporary injectable fillers, *Plast reconstr Surg* 2007;120:98S

Friedman PM, Mafung EA, Kauvar AN, Geronemus RG. Safety data of injectible nonanimal stabilized soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* 2002;28:491
Dover JS, Rubin MG, Bhatia AC. Review of the efficacy, durability and safety data of two nonanimal stabilized hyaluronic acids fillers from a prospective, randomized, comparative, multicentre study. *Dermatol Surg* 2009;35:322

Shafir R, Amir A, Gur E. Long-term complications of facial injections with Restylane (injectable hyaluronic acid). *Plast Reconstr Surg*. 2000 ;106:1215-6.

Andre P. Evaluation of the safety of a non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA -- Q-Medical, Sweden) in European countries: a retrospective study from 1997 to 2001. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18:422-5.

Narins RS, Jewell, Rubin M, Cohen J, Strobos J, Clinical conference: management of rare events following dermal fillers-focal necrosis and angry red bumps. *Dermatol Surg* 2006; 32:426,

Christensen L, Breiting V, Janssen M, Vuust J, Hogdall E. Adverse reactions to injectable soft tissue permanent fillers. *Aesthetic Plast Surg* 2005;29:34;

Gomez de la Fuente E, Alvarez-Fernandez JG, Pinedo F, Naz E, Gamo R, Vicente-Martin FJ, Lopez-Esterabanz JL. Reaccion cutanea tras implante con Bio-Alcamid. *Act Dermatofiliograf* 2007; 98:271;

Pacini S, Ruggiero M, Morucci G, Cammarota N, Protopapa C, Gusilano M. Bio-Alcamid in drug induced lipodystrophy. *Ital J Anat Embriol* 2002;107:202

DoverJS, Rubin MG, Bhatia AC. Review of the efficacy, durability and safety data of two nonanimal stabilized hyaluronic acid fillers from a prospective, randomized, comparative, multicentre study. *Dermatol Surg* 2009;35:322.

Burchard AE, Ellis DAF. The Canadian experience with fillers, *Facial Plastic Surg* 2009: 25:129

Mackley CL, Marks J, Anderson BE. Delayed hypersensitivity to lidocaine. *Arch Dermatol* 2003; 139:343.

Alijotas-Reig J, Garcia-Jimenez V. Delayed immune-mediated adverse effects related to hyaluronic acid and acrylic hydrogel dermal fillers: clinical findings, long-term follow-up and review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 150.

Hamilton RG, Strobos J, Adkinson NF Jr. Immunogenicity studies of cosmetically administered nonanimal-stabilized hyaluronic acid particles. *Dermatol Surg* 2007;33 Suppl 2:S176-85.

Patel VJ, Bruck MC, Katz BE. Hypersensitivity reaction to hyaluronic acid with negative skin testing. *Plast Reconstr Surg* 2006;17: 92e)

Lupton JR, Alster TS. Cutaneous hypersensitivity reactions to injectable hyaluronic acid gel. *J Dermatol surg* 2000; 26:135.

Micheels P, Human anti-hyaluronic acid antibodies: is it possible? *Dermatol Surg* 2001; 27:185

Klein AW. Granulomatous foreign body reaction against Hyaluronic acid (letter to the editor) *Dermatol Surg* 2004; 30:1071.

Lowe NJ, Maxwell CA, Lowe PL, Duick MG, Sha K, Hyaluronic acid fillers: adverse reactions and skin testing, *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:930.

Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leuk Biol* 2010;87:989.

Noble PW, Jiang D, Matrix regulation of lung injury, inflammation, and repair: the role of innate immunity. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:401

Tesar BM, Jiang D, Liang J, Palmer SM, Noble PW, Goldstein DR The role of Hyaluran degradation products as innate alloimmune agonists, *J Am Transplant* 2006; 6:2622.

Braff MH, Gallo RL. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol* 2006;306:91

Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlando M, Tufano MA, Baroni A. Malassezia furfur induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner. Arch Dermatol Res 2004;295:474)

Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sonnaria M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A, Rumio C. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Increases the Self-Defense of Skin Epithelium by Induction of β -Defensin 2 via TLR2 and TLR4. J Immunol 2010;181:2103).

Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA et al Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. J Immunol 2007; 179:744.