

Efecto del tratamiento oral con glucosamina-hesperidina-manganeso en la profundidad de las arrugas y la calidad de la piel

Amselem M.

INTRODUCCIÓN. La nutricosmética está mostrando importantes beneficios en el cuidado de la piel. Presentamos un complemento alimenticio (CA), de administración oral, que combina glucosamina con hesperidina y manganeso, en un protocolo recomendado de tres meses. El objetivo de este estudio fue valorar la capacidad de reducción de la profundidad de las arrugas y la mejora en la calidad de la piel del CA, sólo o combinado con ácido hialurónico (AH) infiltrado.

MATERIAL Y MÉTODO. Estudio prospectivo experimental en el que se ha valorado la profundidad de las arrugas y la calidad de la piel en entrecejo, frente y región orbicular en tres visitas a la consulta: inicial (S0), a los 60 días (S1) y a los 120 días (S2) en un grupo de 29 mujeres con una media de edad de 48,8 años. Se clasificó a las pacientes en tres Grupos: pacientes a las que no se les infiltraba AH y tomaban el CA (Grupo 1), pacientes con AH infiltrado y que tomaban el CA (Grupo 2) y pacientes sometidas previamente a infiltración de AH y que no tomaban el CA (Grupo 3). La valoración fue llevada a cabo por tres observadores (médico, enfermera y paciente) utilizando una escala visual analógica, una escala de mejora global y una escala de satisfacción global.

RESULTADOS. En cuanto a la profundidad de las arrugas, los tres observadores coincidieron en la mejora cualitativa observada en la última visita de los Grupos 1 y 2, así como en la valoración realizada en el entrecejo en el Grupo 3. Con respecto a la de calidad de la piel, en los Grupos 1 y 2 se observó una mejoría en la valoración realizada por los tres observadores, mientras que en el Grupo 3 sólo uno notificó mejoría en el aspecto de la hidratación.

CONCLUSIÓN. La suplementación con el CA parece tener un efecto beneficioso sobre la profundidad de las arrugas y la calidad de la piel del tercio superior de la cara, en pacientes con y sin infiltración previa de AH.

PALABRAS CLAVE. Ácido hialurónico, arrugas, piel, relleno.

INTRODUCCIÓN

La alimentación ha sufrido importantes modificaciones en diferentes aspectos conceptuales a lo largo de los últimos años. La necesidad de atender a nuevas exigencias sociales y de salud ha motivado la aparición de los alimentos funcionales y nutracéuticos que, además de sus funciones nutritivas generales, presentan determinadas propiedades para el mantenimiento de la salud. Los alimentos funcionales y nutracéuticos, consumidos como parte de una dieta equilibrada y acompañados de un estilo de vida saludable ofrecen la posibilidad de mejorar la salud y/o prevenir ciertas enfermedades¹.

Un compuesto nutracéutico se puede definir como un complemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, líquido, etc.) que incorpora una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superiores a la existente en esos alimentos, tiene presumiblemente un efecto favorable sobre la salud mayor del que podría tener el alimento normal¹. Un nutricosmético es un suplemento nutricional formado por sustancias naturales, de origen animal o vegetal, contenido habitualmente en los alimentos, y usado por vía oral a diferentes dosis, para actuar directamente sobre la piel y el cabello².

Por otra parte, de entre el gran conjunto de principios activos de origen nutricional que ejercen un papel protector más destacado a nivel cutáneo, se pueden destacar el licopeno del tomate, la luteína de las espinacas, las catequinas del té, el resveratrol del vino tinto, las

Dr. Moisés Amselem

CLÍNICA DOCTOR MOISÉS AMSELEM.

Calle de Antonio Maura, 7. Madrid.

isoflavonas de la soja, y las vitaminas del tipo de tocoferoles o el ácido ascórbico.^{1,2} Los nutricosméticos están basados en el concepto de que la clave para mejorar el aspecto y la belleza exterior está en la búsqueda de la salud global, es decir, “*la belleza desde el interior*”, y sus efectos pueden ejercerse con diversos fines como la fotoprotección, acción anti-oxidante, anti-inflamatoria, modulación de la respuesta inmune o de reacciones enzimáticas o como señalizadores celulares². Es necesario que previamente se haya demostrado su biodisponibilidad, es decir que se absorban y lleguen a los tejidos diana en cantidades adecuadas, que existan estudios que avalen su eficacia frente a placebo, y poder valorar y cuantificar los cambios a nivel de parámetros como la hidratación, fotoprotección u otros².

Diferentes estudios han demostrado que la glucosamina juega un papel importante en la supervivencia de la célula y ayuda a aumentar su resistencia al estrés³. Además, inhibe la degradación y estimula la síntesis de las cadenas de polisacáridos característicos de los proteoglicanos, suprime la expresión de las enzimas que degradan el colágeno tales como las metaloproteinasas, mientras que incrementa la expresión del colágeno tipo II en los condrocitos. La N-acetil-glucosamina, un derivado de glucosamina, estimula la síntesis de hialuronano a través de la activación de la vía hialuronano sintasa-2 en los condrocitos, al tiempo que inhibe a la interleukina (IL)-1 β , la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa-2 y la IL-6 en los condrocitos⁴, lo cual ocurre de la misma forma en otros tejidos, incluida la piel, aunque aún no se dispone de evidencia.

Así mismo, se ha observado que la glucosamina ejerce una función antioxidante, ya que incrementa la biosíntesis de glutatión, mejorando la respuesta al estrés⁵. También se ha descrito su actividad anti-inflamatoria (suprime la activación de la mieloperoxidasa en las células inflamatorias, así como la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), ciclooxigenasa-2, y la óxido nítrico sintasa inducible, además de reducir los niveles séricos de ciertas citoquinas pro-inflamatorias), en múltiples enfermedades inflamatorias, entre ellas la enfermedad inflamatoria intestinal⁶.

En un estudio realizado en 2015 se vio que la glucosamina inhibía la diferenciación de los adipocitos en ratas obesas (obesidad inducida por una dieta rica en grasas), lo cual es un hallazgo preliminar que demuestra su posible efecto beneficioso en el tratamiento de la obesidad, mejorando la dislipemia y previniendo el aumento de peso corporal⁷. El ácido hialurónico (AH) es un glucosaminoglucano que ocupa la matriz extracelular, el tejido conectivo, las articulaciones, las membranas celulares y el humor vítreo del ojo, entre otros. Es considerado el material ideal para utilizar en rellenos dérmicos, ya que es altamente biocompatible, su estructura es similar en muchas especies de mamíferos, se une en un 80% al agua y tiene

una muy baja probabilidad de desencadenar reacciones inmunológicas⁸. Con el envejecimiento disminuye la síntesis de proteínas de sostén dérmico y los mecanismos de control de calidad de la síntesis de estas proteínas. La sustitución de estas funciones mediante la suplementación de glucosaminoglucanos puede disminuir la velocidad de deterioro de dichos procesos⁸.

De forma paralela a los procesos oxidativos ocurre la aparición de arrugas y otros signos de pérdida del aspecto juvenil de la piel. La administración de antioxidantes en la dieta ha demostrado protección contra el daño tisular inducido por la radiación; en concreto, la hesperidina ha demostrado preservar el tejido de la radiación gamma sobre pulmones de ratas macho, probablemente debido a su efecto protector contra desórdenes inflamatorios a través de la inhibición de la formación de radicales libres y su capacidad estabilizadora de membranas⁹. La hesperidina procede de las frutas cítricas y actúa como neuroprotector, anti-inflamatorio y antioxidante, lo que se ha demostrado en la mejoría de la disfunción endotelial en ratas Wister con hiperhomocisteinemia¹⁰. La hesperidina ha demostrado además que mejora el íleo post operatorio a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria por varios mecanismos que actúan en paralelo¹¹. En un estudio realizado en adultos con sobrepeso, la combinación de hesperidina y cafeína provoca un efecto reductor de los niveles de triglicéridos en sangre, la grasa subcutánea abdominal y el índice de masa corporal (IMC)¹².

El manganeso es un elemento que se encuentra como tal en la naturaleza y se considera un nutriente esencial. Una ingesta adecuada de manganeso en la dieta es esencial para el mantenimiento de numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción y el desarrollo (por ejemplo, en la formación de cartílago y hueso), el metabolismo energético (ej. piruvato descarboxilasa), el ciclo de la urea (ej. arginasa) y la capacidad antioxidante (ej. superóxido dismutasa); juega también un importante papel en la cicatrización de las heridas. Se encuentra habitualmente en complementos alimenticios y preparados multivitamínicos¹³. También se ha demostrado que el uso combinado de manganeso y zinc vía oral durante el periodo periparto disminuye el estrés oxidativo y la inflamación del corion¹⁴.

Hay dos elementos indispensables en la creación de AH: la N-acetilglucosamina y el ácido glucurónico (procedente de la glucosa) actúan como precursores en la formación del AH. Nuestra alimentación es muy rica en glucosa y está muy presente en el organismo¹⁵. Sin embargo, la glucosamina es prácticamente inexistente en nuestra dieta, puesto que se encuentra en los caparazones de los crustáceos, los cuales no consumimos. Para la síntesis de AH, el cuerpo necesita un elemento llamado activador, es decir, el responsable de poner en marcha la reacción de la glucosamina y el ácido glucurónico para crear una molécula de AH, que en muchos casos es el manganeso¹⁶. Debido

al estrés oxidativo y la degradación enzimática diaria, las nuevas moléculas de AH necesitan un elemento protector, para evitar la degradación del AH que fabricamos, papel que puede tomar la hesperidina¹⁷. La combinación de los tres componentes en un complemento oral podría ser clave como antioxidante de la piel, antienvjecimiento y potenciador de otros tratamientos rejuvenecedores¹⁸.

OBJETIVO

Valorar la eficacia de la suplementación con glucosamina, hesperidina y manganeso en la reducción de las arrugas del tercio superior de la cara y mejorar algunos parámetros de la calidad de la piel en pacientes de edad media, actuando en solitario o combinada con la acción del AH infiltrado con anterioridad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico experimental de diseño prospectivo para valorar la influencia de la administración de un complemento oral de glucosamina, manganeso y hesperidina en la mejoría de las arrugas de la frente, la glabella y la región periocular, así como de otras características de la piel como la luminosidad, firmeza, hidratación, densidad y aspecto descansado.

Se seleccionaron 29 mujeres de entre 40 y 60 años de edad (media de edad 48,8 años) que presentaban arrugas en reposo en la frente, glabella y región periocular de grado >3 según la escala del Atlas de signos de envejecimiento cutáneo del rostro de mujeres caucásicas (ANEXO 1). Once fueron incluidas en el Grupo 1 (sin AH previo y que tomaron el CA), doce en el Grupo 2 (con AH previo y que tomaron el CA) y seis en el Grupo 3 (solo inyección de AH).

Se excluyeron las pacientes que habían recibido previamente tratamiento con toxina botulínica en las regiones de la frente, glabella o región periocular en los últimos 6 meses y aquellas que se inyectaran en la misma zona AH desde hacía menos de dos meses o entre 4 y 6 meses antes de comenzar el tratamiento. También fueron excluidas las personas no dispuestas a completar el tratamiento oral; las que lo abandonasen durante 5 días consecutivos o 10 días en total entre visitas; las embarazadas o lactantes; aquellas con enfermedad crónica o ingesta actual de diuréticos; antecedentes de hipersensibilidad al AH, hesperidina, glucosamina o manganeso o que estuvieran tomando complementos con hierro o manganeso.

Se administró a los Grupos 1 y 2 el CA por vía oral. Las pacientes incluidas en los Grupos 1 y 2, tomaron una cápsula y un comprimido al día de CA (Glucosamina 200 mg, manganeso 2 mg y hesperidina 216 mg) en una de las comidas principales, durante 120 días.

Se realizaron valoraciones de la profundidad de las arrugas en reposo, en la frente, glabella y periorbicular según el Atlas de signos de envejecimiento cutáneo por un

profesional de la medicina, un profesional de enfermería y por el propio paciente en los días 0, 60 y 120 posteriores al inicio de la toma del tratamiento oral con el CA. También se valoró la calidad de la piel en las mismas regiones en reposo (frente, glabella y periocular lateral), considerando las siguientes características: hidratación, luminosidad, firmeza, densidad, aspecto descansado-relajado, según una escala EVA (ANEXO 2).

Un profesional de la medicina valoró además, en la segunda y tercera visita, la calidad de la piel según la Escala de Mejora Global: Grado 1: Sin mejoría; Grado 2: Poca mejoría; Grado 3: Mejoría; Grado 4: Bastante mejoría y Grado 5: Mucha mejoría, así como, el grado de satisfacción del tratamiento según la Escala de Satisfacción Global: Grado 1: Insatisfecho; Grado 2: Poco satisfecho; Grado 3: Ni satisfecho Ni insatisfecho; Grado 4: Satisfecho y Grado 5: Muy satisfecho. Por último, se evaluó también la tolerancia al tratamiento y la posibilidad de efectos adversos en los Grupos que habían tomado el CA (Grupos 1 y 2) a los 60 y 120 días.

Las pacientes de los tres grupos realizaron una valoración de la profundidad de las arrugas y de la calidad de la piel según las escalas referidas en las tres visitas y en las dos últimas valoraron la mejoría de la calidad de la piel y la satisfacción global del tratamiento también según las escalas diseñadas para los otros evaluadores.

RESULTADOS

El 76,0% de la muestra tenían piel grasa, el 21,0% normal y el 3,0% piel seca. Un 59,0% habían realizado previamente tratamientos con AH, pero con más de 3 meses transcurridos desde la aplicación. La gran mayoría, el 89,0%, no tenían enfermedades previas y del resto, una presentaba diabetes mellitus y otra hipertensión arterial controlada.

En la evaluación médica, el Grupo 1 mejoró la profundidad de las arrugas en un 33,2%, 26,7% y 40,8% al final del tratamiento en frente, glabella y periorbitario, respectivamente. Con respecto a la calidad de la piel un 43,0% mejoró la hidratación, un 37,5% la luminosidad, un 57,7% la firmeza, un 38,4% la densidad y un 41,2% el aspecto descansado al final del tratamiento (GRÁFICOS 1 y 2). El Grupo 2 disminuyó la profundidad de las arrugas en un 33,3% en la frente, 11,1% en glabella y 4,8% en periorbitario (GRÁFICO 3) y con respecto a la calidad de la piel un 58,7% mejoró la hidratación, un 52,7% la luminosidad, un 21,2% la firmeza, un 21,4% la densidad y un 24,4% el aspecto descansado (GRÁFICO 4). En el Grupo 3 se observó una disminución de la profundidad de las arrugas en la frente en un 20,0%, en glabella un 10,0% y en orbicular un 26,2% (GRÁFICO 5), mientras que con respecto a los parámetros de mejoría global de la piel la hidratación mejoró un 10,8%, 6,7% la luminosidad, la firmeza empeoró un 2,7%, mejoró un 10,5% la densidad y 1,0% el aspecto descansado (GRÁFICO 6).

En la evaluación por parte de la enfermera, el Grupo 1 mejoró la profundidad de las arrugas en un 35,5%, 26,7% y 40,8% al final del tratamiento en frente, glabella y periorbitario respectivamente. Con respecto a la calidad de la piel un 39,7% mejoró la hidratación, 46,7% mejoró la luminosidad, 34,1% la firmeza, 26,2% la densidad y 38,4% el aspecto descansado a fin de tratamiento. El Grupo 2 disminuyó la profundidad de las arrugas en un 30,0% en la frente, 16,0% en glabella y 9,1% en periorbitario y con respecto a la calidad de la piel 37,1% mejoró la hidratación, 39,1% la luminosidad, 29,7% la firmeza, 29,7% la densidad y 27,8% el aspecto descansado. El Grupo 3 disminuyó la profundidad de la arruga en la frente en un 20,0%, en glabella un 10,0% y en orbicular un 26,1%, mientras que con respecto a los parámetros de mejoría global de la piel: la hidratación mejoró un 23,6%, 12,9% la luminosidad, la firmeza empeoró un 7,7%, la densidad mejoró un 4,0% y el aspecto descansado un 3,3%.

Con respecto a la evaluación por parte de los pacientes, el Grupo 1 mejoró la profundidad de las arrugas en un 35,5%, 26,7% y 40,8% al final del tratamiento en frente, glabella y periorbitario respectivamente. Con respecto a la calidad de la piel un 43,0% mejoró la hidratación, 37,5% mejoró la luminosidad, 57,7% la firmeza, 38,4% la densidad y 41,2% el aspecto descansado a fin de tratamiento. El Grupo 2 disminuyó la profundidad de las arrugas en un 30,0% en la frente, 16,0% en glabella y 9,1% en periorbitario y con respecto a la calidad de la piel 56,6% mejoró la hidratación, 72,8% la luminosidad, 43,6% la firmeza, 28,0% la densidad y 41,5% el aspecto descansado. El Grupo 3 disminuyó la profundidad de las arrugas en la frente en un 20,0%, en glabella un 10,0% y en orbicular un 26,1%, mientras que con respecto a los parámetros de mejoría global de la piel la hidratación mejoró un 10,8%, 3,8% la luminosidad, la firmeza un 3,8%, 5,0% mejoró la densidad y 4,2% el aspecto descansado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos revelan que en el Grupo 1 hubo una reducción más marcada de las arrugas periorculares (observada un poco más tarde que en otras zonas de la cara), pero de mayor intensidad de acuerdo a lo observado por los tres evaluadores; en segundo lugar, la mejoría más llamativa se observó en la frente en la valoración en la última visita y de nuevo, coincidieron los tres observadores, lo que pone de manifiesto que la utilización de la suplementación vía oral por sí sola tiene efectos probados y medibles⁴ e influye en los parámetros evaluados, cuando se toma en ciclos de tratamiento de al menos dos meses. Con respecto a los parámetros de calidad de la piel, se evidenció mejoría de todos ellos, en todas las zonas valoradas, de acuerdo a lo observado por los tres evaluadores, con mayor intensidad en la valoración de la última visita, lo cual es concordante con la efectividad de los tratamientos vía oral cuando se cumplen los tiempos del tratamiento.

En el Grupo 2, pacientes con antecedentes de infiltración de AH en las arrugas del tercio superior de la cara y que tomaban el CA, los tres observadores encontraron una mejoría más marcada de la profundidad de las arrugas en la frente, en segundo lugar y observable desde la primera visita en el entrecejo, lo cual se puede interpretar como un efecto potenciador de la efectividad del AH cuando se combina con glucosamina vía oral⁵. Con respecto a los parámetros de calidad de la piel, los tres observadores coincidieron en que todos los parámetros mejoraban hacia la última visita, lo cual se puede explicar porque son mayormente afectados por la suplementación que actúa más lentamente ya que el AH perdería efectividad con el paso del tiempo por su reabsorción fisiológica.

Con respecto al Grupo 3, en el que las pacientes solo se habían inyectado AH, se observó una discreta tendencia a mantenerse el efecto en la profundidad de la arruga en entrecejo y empeorar discretamente en la frente y región periorcular, observación en la que también coincidían los tres observadores, explicable por la degradación fisiológica del AH infiltrado⁶ (en el que no actúa ningún factor colaborador). Con respecto a los parámetros de mejoría de la calidad de la piel, los tres observadores coincidieron en que en torno a la última visita mejoraban someramente la hidratación y luminosidad, destacando la observación hecha por la enfermera sobre los parámetros de firmeza y densidad de la piel en los cuales no se aprecia mejoría.

CONCLUSIONES

Los hallazgos sugieren que la suplementación con un complemento alimenticio que combina glucosamina, manganeso y hesperidina, es efectiva en la mejora de la profundidad de las arrugas del tercio superior de la cara en ambos grupos, tanto en el que había recibido la infiltración previa con ácido hialurónico como el que no tenía este antecedente, siendo valorado de forma coincidente por tres observadores hasta los 120 días de seguimiento. Con respecto a los parámetros secundarios de la calidad de la piel observamos una mejoría más marcada hacia el final del tratamiento con el complemento vía oral, conclusión en la que coincidieron los tres observadores.

Aún así, hace falta realizar estudios controlados con muestras amplias para valorar la eficacia de la utilidad de la suplementación vía oral en diferentes procesos biológicos, sin embargo, hay suficiente evidencia sobre la influencia de la glucosamina en el incremento de la síntesis de colágeno, la organización de las bandas de colágeno y la resistencia a la fatiga, así como el soporte en el manejo del dolor inflamatorio de los tendones²⁵. En el 2014 ya se publicó un estudio donde un complemento vía oral con glucosamina demostraba una importante influencia en la mejoría de los síntomas de la displasia de hombros²⁶, lo que ha dado pie a investigaciones en otros campos.

ANEXO I.

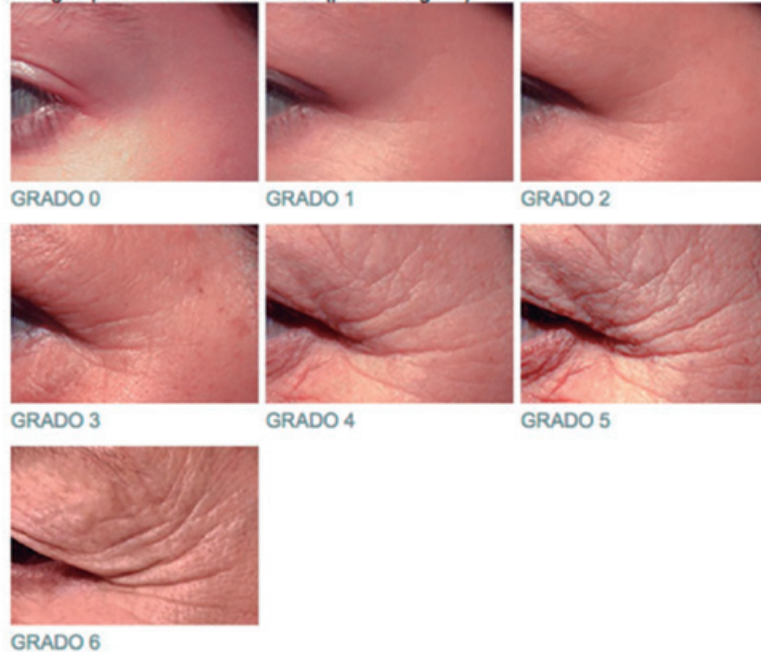
Puntuaciones – Profundidad arrugas

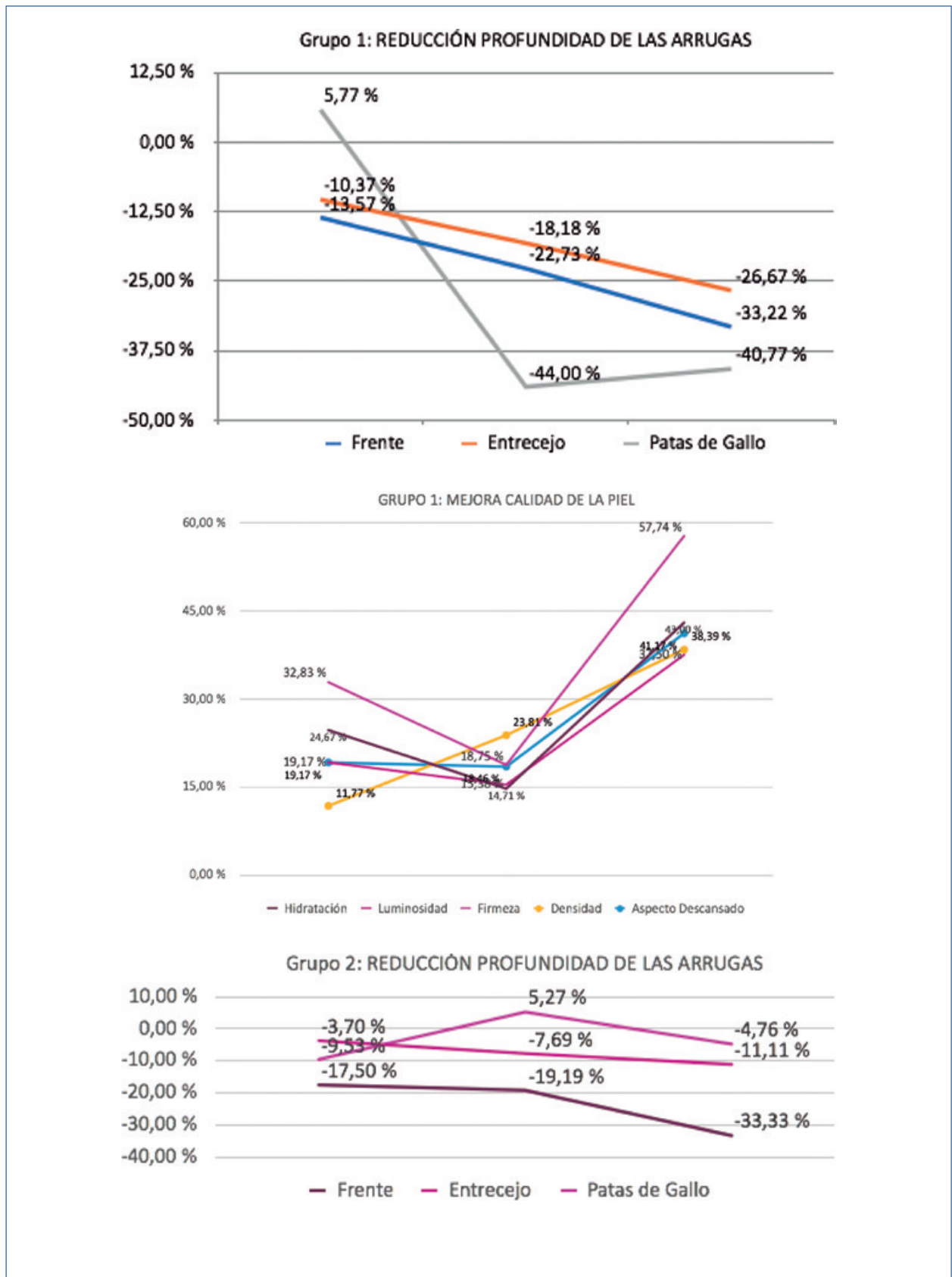
Arrugas del entrecejo (glabella)

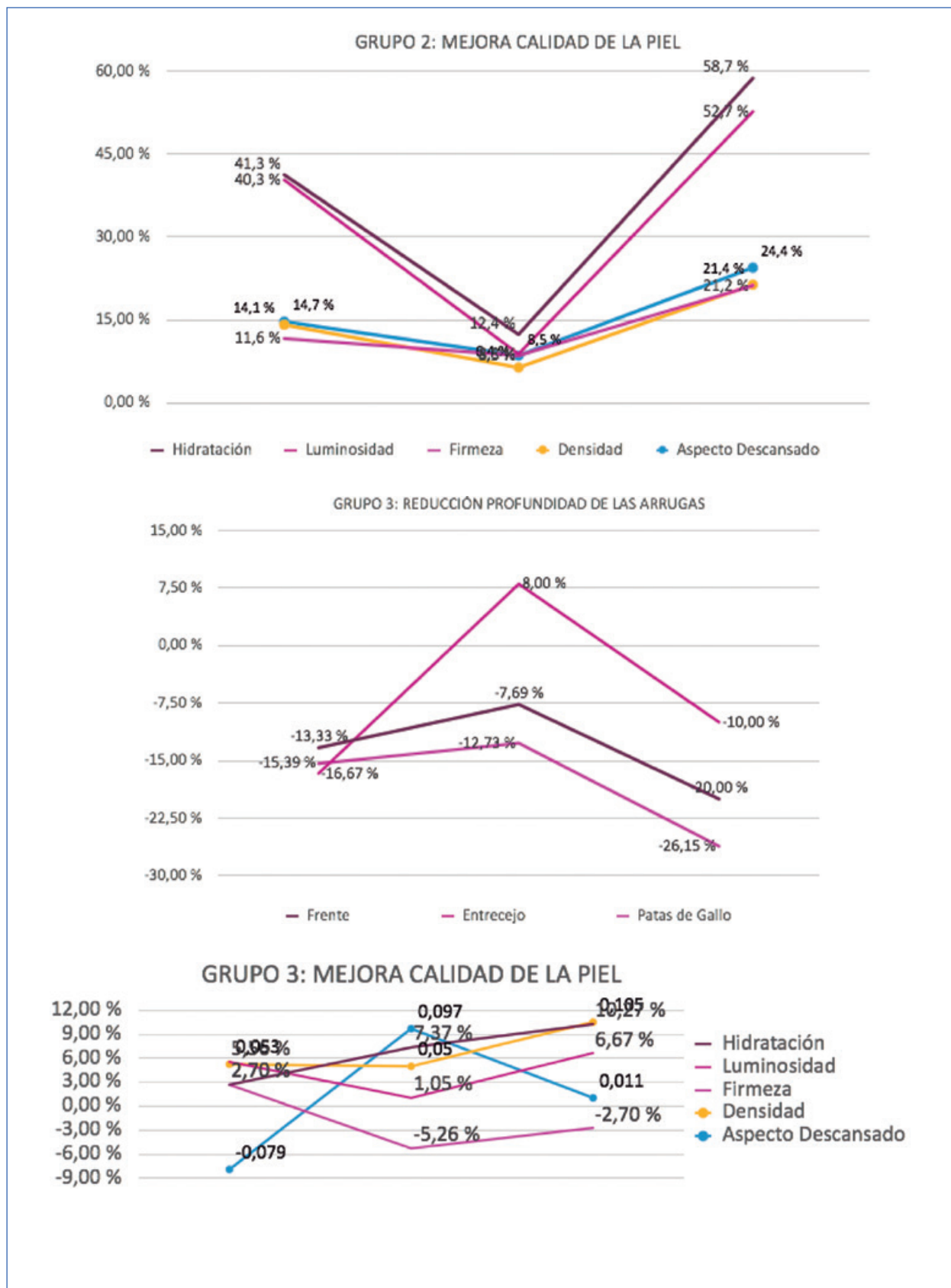


Puntuaciones – Profundidad arrugas

Arrugas periorbitales laterales (patas de gallo)







BIBLIOGRAFÍA

- (1). Alimentos funcionales y nutraceuticos. [Madrid]: Acción Médica; 2007.
- (2). Grupo Español de Dermatología Cosmética y Terapéutica. Academia Española de Dermatología y venereología. Suplementos nutricionales o alimentos funcionales, ¿hasta dónde?. [Internet]. Academia Española de Dermatología y venereología; 2017 [cited 2 August 2017]. Available from: <https://aedv.es/>
- (3). Johnsen M, Späth M, Denzel M, Göbel H, Kubacki T, Hoyer K et al. Oral Supplementation of Glucosamine Fails to Alleviate Acute Kidney Injury in Renal Ischemia-Reperfusion Damage. PLOS ONE. 2016;11(8):e0161315.
- (4). Tomonaga A, Watanabe K, Fukagawa M, Suzuki A, Kurokawa M, Nagaoka I. Evaluation of the effect of N-acetyl-glucosamine administration on biomarkers for cartilage metabolism in healthy individuals without symptoms of arthritis: A randomized double-blind placebo-controlled clinical study. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016.
- (5). Al Omari M, Al-Kurdi Z, Chowdhry B, Leharne S, Qinna N, Badwan A. Influence of glucosamine on the bioactivity of insulin delivered subcutaneously and in an oral nanodelivery system. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;61-67.
- (6). Azuma K, Osaki T, Kurozumi S, Kiyose M, Tsuka T, Murahata Y et al. Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Carbohydrate Polymers*. 2015;115:448-456.
- (7). Huang L, Chen J, Cao P, Pan H, Ding C, Xiao T et al. Anti-Obese Effect of Glucosamine and Chitosan Oligosaccharide in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Marine Drugs*. 2015;13(5):2732-2756. .
- (8). Landau M, Fagien S. Science of Hyaluronic Acid Beyond Filling. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015;136:188S-195S.
- (9). Rezaeyan A, Fardid R, Haddadi G, Takhshid M, Hosseinzadeh M, Najafi M et al. Evaluating Radioprotective Effect of Hesperidin on Acute Radiation Damage in the Lung Tissue of Rats. *Journal of Biomedical Physics Engineering* [Internet]. 2016 [cited 2 August 2017];6(3):165–174. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (10). Hemanth Kumar B, Dinesh Kumar B, Diwan P. Hesperidin, a citrus flavonoid, protects against l-methionine-induced hyperhomocysteinemia by abrogation of oxidative stress, endothelial dysfunction and neurotoxicity in Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*. 2016;55(1):146-155. .
- (11). Xiong Y, Chu H, Lin Y, Han F, Li Y, Wang A et al. Hesperidin alleviates rat postoperative ileus through anti-inflammation and stimulation of Ca²⁺-dependent myosin phosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2016;37(8):1091-1100.
- (12). Ohara T, Muroyama K, Yamamoto Y, Murosaki S. Oral intake of a combination of glucosyl hesperidin and caffeine elicits an anti-obesity effect in healthy, moderately obese subjects: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Nutrition Journal*. 2015;15(1).
- (13). Mattison D, Milton B, Krewski D, Levy L, Dorman D, Aggett P et al. Severity scoring of manganese health effects for categorical regression. *NeuroToxicology*. 2017;58:203-216.
- (14). Osorio J, Batistel F, Garrett E, Elhanafy M, Tariq M, Socha M et al. Corium molecular biomarkers reveal a beneficial effect on hoof transcriptomics in periparturient dairy cows supplemented with zinc, manganese, and copper from amino acid complexes and cobalt from cobalt glucoheptonate. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(12):9974-9982.
- (15). Laurent TC. Biochemistry of hyaluronan. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2017 [cited 2 August 2017]. Available from.
- (16). Tsai H, Everson G, Poole W.J. Effect of manganese deficiency on the acid mucopolysaccharides in cartilage of guinea pigs. *The Journal of nutrition*. 1967;4(91):447-452.
- (17). Magiera S, Baranowska I, Lautenzleger A. UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;102:468-475.
- (18). Kuchmeister H. Hesperidin phosphate as hyaluronidase inhibitor. *Klinische Wochenschrift Journal*. 1954;13-14(32):299-304.
- (19). Galluccio F, Barskova T, Cerinic M. Short-term effect of the combination of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and keratin matrix on early symptomatic knee osteoarthritis. *European Journal of Rheumatology*. 2015;2(3):106-108.
- (20). Martí-Angulo S, García-López N, Díaz-Ramos A. Efficacy of an oral hyaluronate and collagen supplement as a preventive treatment of elbow dysplasia. *Journal of Veterinary Science*. 2014;15(4):569.