

Estudio de eficacia del producto factor de crecimiento epidérmico + ácido hialurónico fórmula

Study of the efficacy of epidermal growth factor + hyaluronic acid formulated product

Inmaculada Vivó Sesé¹, M^a Dolores Plá Miralles², Carolina Carbonell Ripoll², Patricia Ricarte Amorós³, José Manuel López Cacho⁴, Gabriella Russo⁵, Paloma Ramírez⁶, Adolfinia Ruiz Martínez⁷, Fernando Martínez-Martínez⁸

¹Germaine de Capuccini S. A, Área de Dirección Técnica

²Germaine de Capuccini S. A, Área de Investigación y Desarrollo

³Germaine de Capuccini S. A, Área de Asesoría Técnica

⁴Inves Biofarm S. L., Área de Control de Calidad

⁵Inves Biofarm S. L., Área de Investigación y Desarrollo

⁶Máster de la Universidad de Granada

⁷Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada

⁸Departamento de Físicoquímica, Universidad de Granada

Resumen

Con el tiempo las personas presentan envejecimiento celular disminuyendo la síntesis de moléculas tales como el ácido hialurónico, factor del mantenimiento cutáneo, y el factor de crecimiento epidérmico, fundamental para la regeneración epidérmica al tener capacidad mitogénica sobre varias células epiteliales y fibroblastos. Este envejecimiento provoca pérdida de elasticidad y firmeza en la piel y aparición de arrugas. Por esto, se desarrolló un complejo de ultra-regeneración facial cuyos principios activos son el ácido hialurónico y el factor de crecimiento epidérmico. Este estudio pretende demostrar la eficacia del producto en mujeres con signos de envejecimiento facial. Se analizó una muestra aleatoria de 18 voluntarias dividida en 2 grupos (A y B). Al grupo A se le aplicó el producto con un dispositivo y al grupo B se le aplicó manualmente. Inicialmente las voluntarias fueron reunidas para entregarles el producto, darles indicaciones y tomar datos basales. El producto se aplicó a los 7 (primera sesión) y a los 21 días (segunda sesión) siguientes. En la segunda sesión y a los 15 días después de la segunda sesión (35 días) se volvieron a tomar datos de la piel para observar efectos producidos a través del tiempo. El estudio demuestra que el producto atenúa las arrugas reduciendo su volumen, longitud, área y profundidad. Se encontró que los beneficios se mantienen tras dos sesiones de tratamiento. La aplicación con el dispositivo, produjo efectos más rápido y fue el único que tuvo efectos sobre la profundidad de las arrugas. Los testimonios de las participantes fueron satisfactorios. Se puede concluir que el producto desarrollado es efectivo para la eliminación de arrugas, para devolver la elasticidad y la firmeza de la piel, sus efectos son inocuos para la piel sana, se mantienen y mejoran a través del tiempo.

Abstract

Over time people have cellular aging by decreasing the synthesis of molecules such as hyaluronic acid, important for the maintenance of the skin, and the epidermal growth factor, important in the epidermal regeneration as it has mitogenic capacity on various epithelial cells and fibroblasts. This aging causes loss of elasticity and firmness in the skin and wrinkles. This is why a complex of ultra-facial regeneration composed by hyaluronic acid and epidermal growth factor as active ingredients was developed. This study aims to demonstrate the efficacy of this product in women with facial aging. A random sample of 19 volunteers was formed and it was divided into two groups (A and B). The product was applied with a device to group A and manually to group B. Initially the volunteers were pooled to give them the product with some indications and to take baseline data. The product was applied at 7 (first session) and 21 days (second session) after they first met. In the second session and 15 days after the second session (35 days) data from the skin of volunteers was taken to see the effects over time. The study proved that the product reduces wrinkles by reducing their volume, length, area and depth. It was also found that the benefits are maintained after two sessions of treatment. The device method obtained effects more quickly and was the only one that reduced the depth of the wrinkles. Satisfaction of the volunteers was acceptable too. Therefore, it can be concluded that the product is effective for removing wrinkles, restore elasticity and firmness of the skin and its effects are safe and maintained and even improved over time.

Palabras clave: ácido hialurónico, factor de crecimiento epidérmico, regeneración epidérmica, mantenimiento cutáneo, arrugas

Keywords: hyaluronic acid, epidermal growth factor, epidermal regeneration, cutaneous maintenance, wrinkles.

INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular de la piel está compuesta principalmente por dos clases de moléculas: glicosaminoglicanos y proteínas tales como elastina (forma las fibras elásticas las cuales determinan la elasticidad de los tejidos), colágeno (forma las fibras de colágeno las cuales le dan resistencia a los tejidos) y el factor de crecimiento epidérmico. El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano compuesto por unidades repetidas de ácido D-glucurónico y D-N-acetil-glucosaminoglucano. Se encuentra en muchos tejidos del cuerpo especialmente en el tejido conectivo y en la piel (1). Gracias a sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas, el HA realiza importantes funciones en el organismo tales como mantener el espacio extracelular, facilitar el transporte extracelular de iones y nutrientes y participar en el control de la hidratación de los tejidos de la piel y la lubricación por medio del tejido sinovial de las articulaciones (2). Se produce intracelularmente en la membrana celular de los fibroblastos por enzimas especializadas y es degradado por radicales libres presentes en el organismo y por enzimas llamadas hialuronidasas mediante hidrólisis.

Con los años la síntesis de ácido hialurónico en el organismo va disminuyendo y su degradación va aumentando provocando pérdida de volumen, alteración del contorno facial y aparición de arrugas que hacen que el rostro tenga una apariencia envejecida y cansada. Sumado a esto, a medida que las personas van envejeciendo, van acumulando sustancias que se vuelven dañinas para el organismo generando alteraciones tales como la elastosis solar en donde hay acumulación de elastina en la dermis debido a la exposición solar excesiva o prolongada. Estas alteraciones pueden generar fotoenvejecimiento (3)

Los factores de crecimiento forman parte del grupo de las citoquinas y actúan como mediadores endógenos intercelulares frente a diferentes estímulos provocando el desarrollo de las células mediante receptores específicos que reciben y transmiten señales para regular el crecimiento, la proliferación y el metabolismo de las células.

Los factores de crecimiento son esenciales para el mantenimiento de las funciones cutáneas. Una de las funciones más importantes es la remodelación extracelular de la matriz de la piel (4).

Entre los factores de crecimiento se encuentra el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el cual es un polipéptido de 53 aminoácidos que estimula el RNA mensajero, el DNA y la síntesis de proteínas en muchas células.

El EGF tiene capacidad mitogénica sobre una amplia variedad de células epiteliales y fibroblastos (5, 6). Se ha demostrado que estimula la división de queratinocitos *in vitro* y la regeneración epidérmica *in vivo* (7,8).

Debido al envejecimiento celular, la cantidad de EGF presente en la piel va disminuyendo (9) junto a los activadores celulares que estimulan la producción de colágeno y elastinas provocando pérdida de elasticidad y firmeza (10).

Debido a los efectos mencionados por el envejecimiento de la piel, se realizó un estudio sobre la eficacia de un producto desarrollado con el EGF y el AH como principios activos. Ya que ambos son compuestos regeneradores e hidratantes y que se producen en el organismo, se investigó demostrar no sólo que este producto era efectivo para eliminar arrugas y disminuir los rastros del envejecimiento facial, sino que además era inocuo para la piel sana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar la eficacia del producto se realizaron medidas del número, volumen, área, longitud y profundidad de las arrugas de mujeres voluntarias.

Para la obtención de estos parámetros, se tomaron fotografías con Primos High Resolution en las áreas donde se presentaban las arrugas y con Visio Face 1000 D en el rostro completo frontal. Las medidas se hicieron siempre sobre la misma zona de la piel.

Sobre una muestra inicial de 35 voluntarias se seleccionaron 20 mujeres con edades comprendidas entre 44 y 66 años (edad media de 53,75 años). La selección fue realizada por una esteticista Grado Superior, bajo la supervisión de una Licenciada en Medicina y Cirugía. Los criterios de inclusión fueron: mujeres caucásicas entre 40 y 70 años de edad con presencia de signos visibles de envejecimiento cutáneo tales como arrugas marcadas y con necesidad de tratamiento rejuvenecedor o tratamiento antiarrugas. Los criterios de exclusión fueron: piel seborreica o acnéica, patologías cutáneas en la zona a evaluar, hiperreactividad cutánea, alergias cutáneas, mujeres que estuvieran en tratamientos con Vitamina A ácida o sus derivados en los tres meses previos al inicio del estudio, mujeres que hayan estado en tratamientos con fármacos tópicos tales como corticoides, antihistamínicos y antiinflamatorios los 10 días previos al inicio del estudio y mujeres con previsión de vacunarse durante el periodo de estudio, siendo la última vacuna dentro de las tres semanas anteriores al estudio.

Si alguna voluntaria tuviese una necesidad terapéutica con alguno de los anteriores tratamientos, tendría que excluirse del mismo.

A cada voluntaria se le indicó que en caso de presentar alguna reacción que considerara anómala durante el tratamiento se pusiera en contacto e informara el evento. Todas las voluntarias firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio.

Las 20 voluntarias se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 10 personas (Grupo A y Grupo B). Las voluntarias del grupo A recibieron tratamiento aplicando el producto EGF + HA Fórmula con una técnica de introducción transdérmica digital llamada DTI System Solution y las voluntarias del grupo B recibieron tratamiento aplicando el producto manualmente. El sistema de inducción transdérmica digital facilita la introducción de activos que antes eran muy difíciles de introducir debido a sus características fisicoquímicas (pesos moleculares elevados, con distintos grados de lipofilia, no ionizables, etc.) y permite una elevada selectividad en los tratamientos ya que los principios activos se pueden depositar con la profundidad requerida en cada terapia.

La técnica se basa en el empleo de ondas hectométricas, controladas digitalmente para dosificar de modo exhaustivo la energía depositada por unidad de superficie en tiempo real, sin alterar en ningún caso los activos. Además el proceso no genera aumento de temperatura, evitando efectos no deseados de desnaturalización de activos o desestabilización de las preparaciones. Las radiaciones no son ionizantes ni acumulativas, no producen cambios en la estructura de los tejidos ni alteran las propiedades fisicoquímicas de la piel.

Durante el estudio se produjo un abandono voluntario en cada grupo, obteniéndose un número final de 9 voluntarias en cada uno.

El producto se aplicó durante dos sesiones (día 7 y día 21) y se tomaron los datos en tres ocasiones (día 0, día 21 [tras la segunda aplicación] y Día 35 [dos semanas después de la segunda aplicación]) Se tomaron los datos al día 35 para evaluar si el efecto se mantenía en el tiempo durante al menos dos semanas.

La aplicación del producto y la toma de los datos en cada sesión se realizaron de la siguiente manera:

Inicialmente (Día 0), las voluntarias fueron citadas, desmaquilladas y fotografiadas con Primos High Resolution en las áreas donde presentaban arrugas y con Visio Face 1000 D en el rostro completo frontal para determinar el número de arrugas y las características de la piel. Posteriormente se les asignó el grupo al

que pertenecían. El mismo día, a cada voluntaria se le entregó una crema con protección solar SPF 50 para preparar la piel antes de recibir el tratamiento en cabina, una máscara exfoliante a base de AHA (ácido glicólico 17%, ácido tartárico 5%, ácido cítrico 2% pH= 4,0) y BHA (ácido glicólico 7%, ácido salicílico 0,4%, ácido cítrico 0,2%, ácido tartárico 0,2%, pH 3,98) y una emulsión exfoliante enzimática (ácido glicólico 5%, papaína 0,37%, pH 4,16) para promover la descamación de la capa de la córnea mejorando con ello la hiperqueratinización, la regeneración y la permeabilidad de la piel y permitir una exfoliación progresiva y controlada.

A las voluntarias seleccionadas se les indicó, por medio de la esteticista, que durante el tratamiento se aplicaran únicamente los productos indicados, a excepción de productos de maquillaje que no tuviesen efecto antienviejimiento ni rejuvenecedor.

Los productos anteriormente indicados se aplicaron durante todo el tratamiento según las siguientes pautas:

– Por la mañana y/o por la noche limpiar la piel con su producto habitual. A continuación aplicar un concentrado activador hidro-retexturizante, consistente en una emulsión exfoliante enzimática a base de Ácido glicólico 5%, papaína 0,37%, pH = 4,16 y después la crema habitual para el tipo de piel con protección solar sólo por la mañana.

– Una vez por semana exfoliar la piel aplicando la máscara exfoliante entregada. La semana que coincida con la realización de la sesión en cabina, realizar la exfoliación 3-4 días antes.

– Las voluntarias que usaran otros productos como contorno de ojos, podrían seguir usándolos. En caso de usar habitualmente un serum previo a la crema, debían dejar de usarlo, ya que el concentrado activador hidrotecturizante realizaba la misma función.

A los 7 días de haber citado a las voluntarias por primera vez (Día 7), tuvieron la primera sesión de aplicación del producto en cabina. El tratamiento en cabina consistió en:

Grupo A:

Limpiar la piel con leche-tónico adecuado al tipo de piel y exfoliarla con un tratamiento profesional de exfoliación química, no invasivo, que elimina las capas superiores de células muertas de la piel a la vez que estimula la regeneración celular cutánea, consistente en un gel exfoliante a base de AHA.

Realizar una sesión aplicando la mezcla de EGF + HA Fórmula (1 vial + 1 ampolla) por el método DTI System Solution en el nivel 2 durante un tiempo aproximado de 30 a 35 minutos.

Realizar el sellado.

Masajear el producto restante unos minutos de forma manual.

Grupo B:

Limpiar la piel con leche-tónico adecuado al tipo de piel y exfoliarla con el tratamiento profesional de exfoliación química, no invasivo indicado anteriormente.

Sin aplicar el producto, realizar un masaje manual con un rodillo masajeador con esferas de germanio durante 10 minutos.

Aplicar manualmente la mezcla de EGF + HA Fórmula (1 vial + 1 ampolla) y masajear con el rodillo masajeador durante un máximo de 4 minutos.

Añadir 2 pulsaciones de crema masajeadora facial y realizar un masaje manual durante 5 minutos.

Incorporar el rodillo masajeador y realizar un masaje durante 20 minutos.

En caso que la piel quede untuosa, limpiar con un pañuelo de papel.

Las voluntarias tuvieron la segunda sesión del tratamiento en cabina 14 días después de la primera sesión (Día 21). Tras esta segunda sesión, se volvieron a tomar fotografías con Primos High Resolution y Visio Face 1000 D y se registraron los datos y observaciones encontradas. La tercera toma de datos del tratamiento se realizó 15 días después de la segunda sesión (Día 35). En esta ocasión se tomaron fotografías a cada voluntaria con Primos High Resolution y Visio Face 1000 D para evaluar si dos semanas después del tratamiento se habían mantenido los efectos producidos o si por el contrario se habían perdido. Al finalizar el tratamiento, a cada voluntaria se le realizó una encuesta subjetiva para obtener su grado de satisfacción.

Los datos obtenidos en las tres etapas, se analizaron estadísticamente mediante un test de Student para muestras relacionadas con el programa estadístico informático SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado en mujeres que no presentaban ninguna patología y que no estuvieran embarazadas ya que al ser un producto cosmético, el estudio debía realizarse en mujeres sanas.

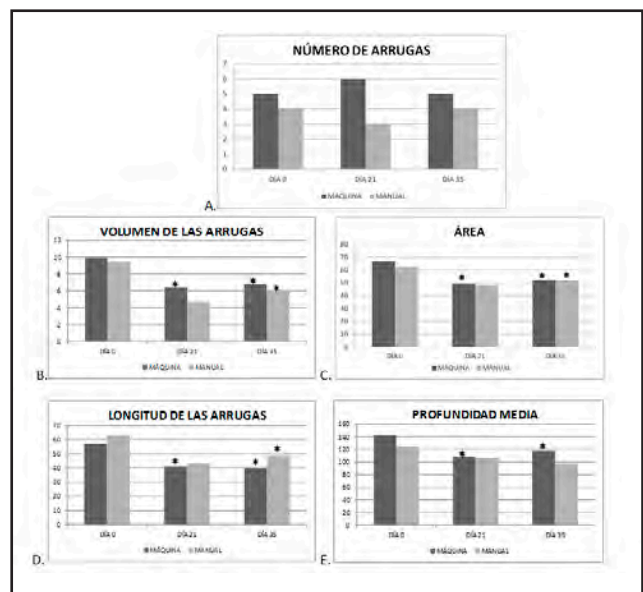


Imagen nº 1. Medianas de las características evaluadas entre las voluntarias tratadas con el método manual (Grupo A) y con dispositivo (Grupo B) en los días 0, 21 y 35. A. número de arrugas; B. volumen de las arrugas; C. área de las arrugas; D. longitud de las arrugas; E. profundidad media de las arrugas. * $p < 0.05$ con respecto a basal.

La Imagen nº 1 muestra la mediana del número, volumen, área, longitud y profundidad de las arrugas de las voluntarias comparando el método manual (Grupo A) representado en color claro y el método con dispositivo (Grupo B) representado en color oscuro. Con respecto al número de arrugas, en los datos obtenidos no se aprecia ningún cambio estadísticamente significativo durante su estudio. Respecto al volumen, área y longitud de las arrugas, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al compararlos con los valores iniciales ya que, como se observa en la Imagen nº 1, estos parámetros, en ambos grupos, fueron disminuyendo significativamente a medida que fue pasando el tiempo. La mediana

del volumen de arrugas de las voluntarias del grupo A bajó un 31.28 % a los 35 días y en el grupo B un 37.35 %. La mediana del área de arrugas del grupo A, bajó un 21.99 % a los 35 días y un 16.85 % en el grupo B y la mediana de la longitud de las arrugas de las voluntarias del grupo A bajó un 29.82 % al final del estudio y un 22.22 % en el grupo B.

Estos resultados indican la buena eficacia de ambos métodos y un efecto en magnitud bastante similar tras las dos aplicaciones del producto. Sin embargo cuando analizamos el momento en el que se empieza a apreciar estadísticamente el efecto de mejora con respecto a los basales, es con la aplicación con máquina cuando aparece antes.

El efecto con ambos métodos es parecido en intensidad tras las dos semanas de la segunda aplicación (Día 35).

Estos datos demuestran que la formulación consigue hacer el efecto deseado en ambos casos pero gracias al mecanismo de aplicación del sistema DTI, el efecto es mucho más rápido. Este sistema en una primera fase permeabiliza el estrato córneo incrementando su receptividad, facilitando la difusión y penetración de los activos para que en una segunda fase se produzca la penetración de los principios activos hasta el plano cutáneo deseado (Epidermis, Dermis o Hipodermis).

Según esto, parece que sólo habría diferencias entre los métodos en la rapidez de la aparición de los efectos, pero si observamos la profundidad media de las arrugas encontramos la principal diferencia entre ambos métodos.

Como se puede observar, la mediana de la profundidad media de las arrugas disminuyó significativamente el día 21 y en el 35 pero sólo cuando la aplicación había sido por el método DTI.

Las arrugas tienden a ser más marcadas y a aumentar en su número con la edad. Por esta razón suelen ser, entre otros aspectos, el principal foco de los tratamientos contra los signos de la edad. Por tanto y en función de los resultados obtenidos, se estima que la aplicación de la formulación con el sistema DTI es de mayor utilidad que la aplicación manual por la rapidez de la aparición de los efectos y por su efecto en las zonas más problemáticas de las arrugas.

Este efecto se puede ver también en fotografías tomadas a las voluntarias durante el estudio. En la Imagen nº 2 se muestra a modo de ejemplo el rostro de una de las voluntarias del estudio en donde se evidencia la disminución de arrugas. Las pocas arrugas que se logran observar después del tratamiento son menos profundas, tienen menos longitud, menos área y menos volumen que las evidenciadas antes del tratamiento.

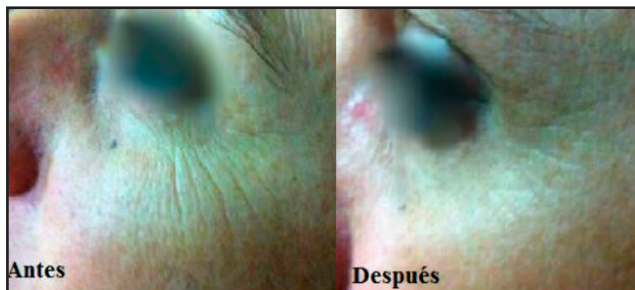


Imagen nº 2. Comparación de arrugas antes y después del tratamiento.

Las medianas de los datos obtenidos con las fotografías tomadas utilizando Primos High Resolution y con Visio Face 1000 D en el rostro completo frontal se resumen en la Tabla nº 1.

MÉTODO CON DISPOSITIVO					
PARÁMETRO	DÍA 0	DÍA 21	DÍA 35	DIFER. ENTRE 0 Y 21 DÍAS	DIFER. ENTRE 0 Y 35 DÍAS
Nº ARRUGAS	5,00	6,00	5,00	20,00%	0,00%
VOLUMEN	9,88	6,40	6,79	-35,22%	-31,28%
ÁREA	66,89	49,23	52,18	-26,40%	-21,99%
LONGITUD	57,00	41,00	40,00	-28,07%	-29,82%
PROFUNDIDAD	142,00	108,00	118,00	-23,94%	-16,90%
MÉTODO MANUAL					
PARÁMETRO	DÍA 0	DÍA 21	DÍA 35	DIFER. A LOS 21 CON BASAL	DIFER. A LOS 35 DÍAS CON BASAL
Nº ARRUGAS	4,00	3,00	4,00	-25,00%	0,00%
VOLUMEN	9,45	4,67	5,92	-50,58%	-37,35%
ÁREA	62,45	47,74	51,93	-23,55%	-16,85%
LONGITUD	63,00	43,00	49,00	-31,75%	-22,22%
PROFUNDIDAD	124,00	106,00	96,45	-14,52%	-22,22%

Tabla 1. Resultados obtenidos (medianas) tras el tratamiento con dispositivo y con método manual a tiempos 0, 21 y 35 días. En negrita se exponen los resultados estadísticamente significativos con respecto a los valores basales (0 Días) ($p < 0.05$).

ASPECTO EVALUADO	% AFIRMATIVO
Arrugas y líneas de expresión atenuadas	100%
Disminución de la profundidad de las arrugas	85%
Disminución de la longitud de las arrugas	85%
Desaparición de algunas líneas de expresión finas	85%
Piel más firme, con óvalo facial redefinido	90%
Textura de la piel más refinada, más suave y aterciopelada	95%
Piel más revitalizada en un rostro iluminado que refleja una nueva juventud	90%
Piel más hidratada	85%
Piel más lisa y radiante, con un aspecto más saludable	100%
Signos de cansancio atenuados	85%
Piel más confortable, con sensación de bienestar	90%
Piel más nutrida	90%
Aspecto general del rostro más rejuvenecido	95%
Cubre las necesidades de mi piel como tratamiento antiedad	100%
Lo considera un verdadero tratamiento antiedad VIP, rápido y eficaz.	95%
Sustituiría una intervención mínimamente invasiva por este tratamiento.	90%
Puede suponer una alternativa natural a las inyecciones.	85%

Tabla nº 2. Datos subjetivos de satisfacción de las voluntarias.

Por otro lado, se realizó una valoración subjetiva en donde las voluntarias sometidas al tratamiento fueron encuestadas para evaluar el grado de satisfacción y verificar la aceptabilidad y compatibilidad cutánea del producto. En la Tabla nº 2 se observan los porcentajes de satisfacción de las voluntarias que participaron en el estudio.

Como se muestra, el 100% de las voluntarias afirmó que las arrugas y líneas de expresión se atenuaron con el tratamiento, y considera que el tratamiento al que fueron sometidas cubre las necesidades de su piel como tratamiento rejuvenecedor y de antienvjecimiento. Entre el 90 y el 95% de las voluntarias obtuvo beneficios cutáneos con una piel más firme, más refinada, más suave, más aterciopelada, más revitalizada, más confortable, más nutrida y más rejuvenecida. El 85% de las mujeres mostró disminución en la profundidad y en la longitud de las arrugas.

Durante el tratamiento no se presentó ninguna reacción adversa y ninguna voluntaria reportó presencia de eventos no deseados como calor, escozor, prurito (comezón), tirantez o quemazón.

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la fórmula del producto EGF y AH como principios activos, es efectiva para el tratamiento de los signos de la edad.

El efecto se ha demostrado por dos métodos: la aplicación manual o utilizando la técnica de introducción transdérmica digital a nivel dérmico (DTI System Solution). En ambos casos se logró una acción rejuvenecedora sobre el volumen, área y longitud de las arrugas tras dos aplicaciones del producto, pero el efecto se obtuvo antes mediante la aplicación con el sistema DTI. En cuanto a la intensidad de los efectos con uno u otro método, no se detectaron diferencias entre ambos métodos a los 35 días.

La principal diferencia entre ambos métodos radicó en la rapidez de la aparición de los efectos y en que sólo mediante la aplicación con el sistema DTI se observó acción sobre la profundidad de las arrugas.

Además de observar que el producto fue efectivo para el tratamiento de los signos del envejecimiento, también se comprobó que es un producto seguro ya que ninguna de las voluntarias presentó efectos adversos durante su aplicación.

Mediante una encuesta subjetiva, se concluyó que las voluntarias quedaron satisfechas con los resultados ya que todas consideraron que el producto cubría las necesidades de su piel para el tratamiento del envejecimiento. Asimismo todas observaron arrugas y líneas de expresión atenuadas en sus rostros.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado a través de un contrato de investigación con la Fundación General Universidad de Granada – Empresa, los laboratorios Germaine de Capuccini y los laboratorios Inves Biofarm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arpicco S., Milla P., Stella B., Dosio F., (2014). Hyaluronic acid conjugates as vectors for the active targeting of drugs, genes and nanocomposites in cancer treatment. *Molecules*, 17; 19(3):3193-230.

2. Cowman M.K., Matsuoka S., (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, 340, 791–809.
3. Ghersetich, I., Lotti, T., Campanile, G., Grappone, C. And Dini, G. (1994). Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatol*. 1994 Feb; 33(2):119-22.
4. Olczyk P., Mencner Ł., Komosinska-Vassev K., (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.*; 2014:747584.
5. An J.J., Eum W.S., Kwon H.S., Koh J.S., Lee S. Y., Baek J. H., Cho Y. J., Kim D. W., Han K. H., Park J., Jang S. H., Choi S. Y., (2013). Protective effects of skin permeable epidermal and fibroblast growth factor against ultraviolet-induced skin damage and human skin wrinkles. *Cosmet Dermatol.*; 12(4):287-95.
6. James G., Rheinward & Howard Green (1977). Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*, 265; (5593): 421-424.
7. Kim D., Kim S. Y., Mun S. K., Rhee S., Kim B. J., (2015). Epidermal growth factor improves the migration and contractility of aged fibroblasts cultured on 3D collagen matrices. *Int J Mol Med.*, 2015.
8. Matsumoto Y., Kuroyanagi Y., (2010). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor; *J Biomater Sci Polym Ed*; 2010.
9. Reenstra, W. R., Yaar, M., and Gilchrist, B. A. (1996). Aging affects epidermal growth factor receptor phosphorylation and traffic kinetics. *Exp. Cell Res*. 227,252–255
10. Quan T., Fisher G. J., (2015). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 2015.