



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNO LIMA RODRIGUES

NÚMERO DE PLAQUETAS E NÍVEIS DE FATORES DE CRESCIMENTO NO
PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) FRESCO E LIOFILIZADO, E SUA
CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CAPILAR E EFEITO
CLÍNICO NA ALOPECIA ANDROGENÉTICA

*PLATELET NUMBER AND GROWTH FACTORS LEVELS IN FRESH AND
LYOPHILIZED PLATELET RICH PLASMA (PRP) AND ITS CORRELATION WITH
HAIR GROWTH PARAMETERS AND CLINICAL EFFECT IN ANDROGENETIC
ALOPECIA*

Campinas

2017

BRUNO LIMA RODRIGUES

NÚMERO DE PLAQUETAS E NÍVEIS DE FATORES DE CRESCIMENTO NO
PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) FRESCO E LIOFILIZADO, E SUA
CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CAPILAR E EFEITO
CLÍNICO NA ALOPECIA ANDROGENÉTICA

*PLATELET NUMBER AND GROWTH FACTORS LEVELS IN FRESH AND
LYOPHILIZED PLATELET RICH PLASMA (PRP) AND ITS CORRELATION WITH
HAIR GROWTH PARAMETERS AND CLINICAL EFFECT IN ANDROGENETIC
ALOPECIA*

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICCHINO-BIZZACCHI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO BRUNO LIMA RODRIGUES, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JOYCE MARIA
ANNICCHINO-BIZZACCHI

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R618n Rodrigues, Bruno Lima, 1989-
Número de plaquetas e níveis de fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas (PRP) fresco e liofilizado, e sua correlação com parâmetros de crescimento capilar e efeito clínico na alopecia androgenética / Bruno Lima Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Joyce Maria Annichino Bizzacchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alopecia. 2. Plasma rico em plaquetas. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Platelet number and growth factors levels in fresh and lyophilized platelet rich plasma (PRP) and its correlation with hair growth parameters and clinical effect in androgenetic alopecia

Palavras-chave em inglês:

Alopecia

Platelet rich plasma

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichin-Bizzacchi

Andrea Fernandes Eloy da Costa Franca

Helio Moraes de Souza

Data de defesa: 22-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNO LIMA RODRIGUES

ORIENTADOR: PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

- 1. PROF. DRA JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI**
 - 2. PROF. DRA ANDREA FERNANDES ELOY DA COSTA FRANCA**
 - 3. PROF. DR. HELIO MORAES DE SOUZA**
-

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 22/02/2017

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dalo e Iza.

Eles, que tanto me disseram “podem tirar tudo de você, menos seu conhecimento”, me incentivaram aos estudos desde criança, sempre proporcionando uma vida digna para crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas, e que concretizar nossos sonhos só dependerá de nossa força de vontade. Mesmo nos momentos em que precisaram ser duros, fizeram isso com amor e respeito. Nunca usaram de autoridade comigo para me ensinar nada pela dor, sempre usaram as vias do amor. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais por todo o apoio, amor, carinho, atenção e paciência, não só durante o período deste estudo, mas por toda a vida. Sem dúvidas, não conseguiria alcançar tudo que almejo sem seu suporte e motivação.

À professora Dra. Joyce, que me deu a honra de ser seu aluno e a confiança de conduzir este estudo. Sua orientação me fez estender meus limites e perceber que posso ser muito mais do que penso ser.

À Silmara que, com sua visão científica, me deu o auxílio necessário para que este trabalho tenha a qualidade que tem.

À Francesca, a quem corria nas horas do desespero desde a época da graduação, e esteve comigo nos altos e baixos durante este período, sempre me fazendo feliz com seu jeito espontâneo e engraçado.

A todos funcionários e alunos do Hemocentro da Unicamp por sempre compartilharem conhecimento, e pela paciência em me ensinarem tudo que precisei.

E a todos meus amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a formar o quem que sou hoje.

RESUMO

Alopecia androgenética (AAG) é caracterizada por uma perda padrão de cabelo, e atualmente, entre os novos tratamentos, podemos citar o uso do plasma rico em plaquetas (PRP). A resposta ao PRP é controversa, e isto poderia estar relacionado ao número de plaquetas e aos níveis de fatores de crescimento presentes no produto. O objetivo deste projeto foi analisar o número de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento (PDGF-AA, EGF e VEGF) presentes no PRP fresco e liofilizado, e sua correlação com os parâmetros de crescimento capilar em pacientes diagnosticados com AAG, usando o *TrichoScan* como método objetivo de avaliação, em dois desenhos de estudo. No primeiro, quinze pacientes receberam aplicação de PRP fresco. Os resultados mostraram aumento significativo na contagem de fios ($p = 0,0018$) e na porcentagem de fios anagênicos ($p = 0,0070$). Porém, estes resultados não foram correlacionados com a quantificação plaquetária e/ou quantificações dos fatores de crescimento no PRP. No segundo estudo, foi utilizado o PRP liofilizado em vinte e dois pacientes (onze no grupo tratamento e onze no grupo controle), com três injeções mensais. Porém, o resultado clínico observado não foi significativo em nenhum dos parâmetros avaliados ($p = 0,206$ para contagem de fios, e $p = 0,398$ para porcentagem de fios anagênicos). A contagem de plaquetas e a concentração dos fatores de crescimento presentes no PRP liofilizado também não foram correlacionados com a resposta obtida. Esta falta de correlação com os dois tipos de PRP aponta que outros mecanismos ou outros fatores de crescimento não quantificados neste projeto podem estar envolvidos nessa resposta.

Palavras-chave: alopecia, queda de cabelo, plasma rico em plaquetas, PRP.

ABSTRACT

Androgenetic alopecia (AGA) is characterized by a pattern hair loss, and currently, among the new treatments, we can mention the use of platelet rich plasma (PRP). The response to PRP is controversial, and this could be related to the number of platelets and levels of growth factors present in the product. The objective of this project was to analyze the number of platelets and levels of growth factors (PDGF-AA, EGF and VEGF) present in fresh and lyophilized PRP, and their correlation with the parameters of hair growth in patients diagnosed with AAG, using TrichoScan as an objective evaluation method, in two different studies. In the first study, fifteen patients received application of fresh PRP. The results showed a significant increase in hair count ($p = 0.0018$) and in the percentage of anagen hair ($p = 0.0070$). However, these results did not correlated with platelet quantification and/or quantification of growth factors in PRP. In the second study, lyophilized PRP was used. However, the observed clinical result was not significant in any of the evaluated parameters ($p = 0.206$ for hair count, and $p = 0.398$ for percentage of anagen hairs). The platelet count and concentration of growth factors present in the lyophilized PRP also did not correlated with the response obtained. This lack of correlation with the two types of PRP indicates that other mechanisms or other growth factors not measured in these studies may be involved in this response.

Keywords: alopecia, hair loss, platelet rich plasma, PRP.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAG	Alopecia androgenética
ACD	Citrato ácido dextrose
Akt	Proteína quinase B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitaria
BMP	Bone morphogenetic proteins
DHT	Dihidrotestosterona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK	Sinalização de quinase regulada por sinal extracelular
FDA	Food and Drugs Administration
FGF-7	Fator de crescimento de fibroblastos-7
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular 2
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
MHC-II	Complexos de histocompatibilidade maior classe II
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
POD	Deleção programada do órgão
PRGF	Plasma rico em fatores de crescimento
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PSA	Antígeno Prostático Específico
RA	Receptores androgênicos
RTK	Receptor tirosina quinase
Shh	Sonic hedgehog
T4L	Tiroxina livre
TGF- β	Fator de crescimento transformador

TSH	Hormônio estimulante da tireoide
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	Via canonical wingless

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de artigos sobre o uso do PRP na AAG.....	34
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema das 4 fases do ciclo de crescimento capilar	12
Figura 2: Interações biomoleculares presentes no desenvolvimento folicular e reguladores do ciclo de crescimento capilar	13
Figura 3: Processo de miniaturização do folículo na presença de maior quantidade de DHT	15
Figura 4: Escala Norwood-Hamilton para classificação de AAG.....	18
Figura 5: Algoritmo criado pelo <i>European Consensus Group</i> para facilitar o diagnóstico de AAG durante a rotina clínica.....	21
Figura 6: Presença de halos marrons em volta da abertura folicular, aparência de couro cabeludo típica de AAG.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Alopecia Androgenética (AAG)	9
1.2 Ciclo do Crescimento Capilar	10
1.3 Fisiopatologia	14
1.4 Classificação e Avaliação da AAG	17
1.5 Diagnóstico da AAG.....	21
1.5.1 <i>Pull Test</i>	21
1.5.2 Dermatoscopia	22
1.5.3 Tricograma.....	23
1.5.4 <i>Trichoscan</i>	23
1.5.5 Biópsia	24
1.6 Tratamentos	24
1.6.1 Minoxidil.....	25
1.6.2 Finasterida	26
1.6.3 Implante Capilar Autólogo	27
1.6.4 Outros Tratamentos.....	27
1.7 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	28
1.7.1 Uso De PRP Na AAG.....	30
2. JUSTIFICATIVAS	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
4.1 Seleção Dos Pacientes.....	38
4.2 Inclusão Dos Pacientes.....	38
4.3 <i>TrichoScan</i>	39
4.4 Desenho dos estudos.....	39
4.5 Preparo do PRP	40
4.5.1 PRP Fresco	40
4.5.2 PRP Liofilizado	41
4.6 Quantificação Dos Fatores De Crescimento.....	43
5. ASPECTOS ÉTICOS.....	44
6. Resultados.....	45
6.1 Capítulo I.....	46
6.2 Capítulo II.....	63

7. DISCUSSÃO GERAL	79
8. CONCLUSÃO	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alopecia Androgenética (AAG)

Alopecia é o nome dado à queda de cabelo resultante de diversos fatores, tais como deficiência congênita ou genética, uso de medicamentos, doenças sistêmicas, e alteração hormonal. (Gordon *et al*, 2011, Novak *et al*, 2009). Os tipos mais comuns de alopecia são a androgenética, causada por uma alta expressão da enzima 5- α -redutase; a areata, decorrente de reação autoimune; e o eflúvio telogênico, originado pela entrada prematura e sincronizada de folículos na fase exogênica (de desprendimento capilar) (Paus *et al*, 1999).

A alopecia androgenética (AAG) é considerada o tipo mais comum de alopecia tanto em homens quanto em mulheres, e é caracterizada por uma queda padrão de cabelo (Sinclair, 1998). A região em que há a queda de cabelo varia de acordo com o gênero: em homens, é mais comum na região fronto-temporal e no vértice craniano, e em mulheres, a região mais acometida é a centro-parietal e, menos frequentemente, a região frontal (Shapiro *et al*, 2000). Essa caracterização é devido à herança genética, em que determinados folículos pilosos são miniaturizados, até se tornarem ineficazes na produção de fios de cabelo (Cotsarelis *et al*, 2001). Apesar da AAG manifestar-se por volta dos 40 anos de idade, a prevalência é de 30% nos homens de raça caucasiana com idade até 30 anos, e de 50% naqueles acima de 50 anos (Thomas, 2005). Por razões ainda desconhecidas, esta prevalência é maior em homens de etnia asiática, e menor em homens de raça negra (Paus *et al*, 2008, Pathomvanich *et al*, 2002, Setty, 1970).

A AAG é causada devido à alta expressão da enzima 5- α -redutase, que tem como função catalisar a reação de conversão de testosterona em

dihidrotestosterona (DHT), dois hormônios androgênicos indispensáveis para o desenvolvimento masculino (Inui *et al*, 2011). O mecanismo destes hormônios na AAG é desconhecido, mas acredita-se que, por conter receptores androgênicos, a papila dérmica, indispensável na manutenção do ciclo de crescimento capilar, seja o principal alvo da DHT (Sinclair, 1998). Achados no ciclo de crescimento na AAG, tais como diminuição do tempo dos folículos na fase anagênica (de crescimento), e aumento do tempo na fase telogênica (descanso), reforçam essa hipótese. (Inui *et al*, 2011, Ellis *et al*, 2002, Cotsarelis *et al*, 2001, Kaufman, 1996).

1.2 Ciclo do Crescimento Capilar

O crescimento capilar é um processo cíclico que compreende 4 fases: anagênica, catagênica, telogênica e exôgenica (figura 1) (Stenn *et al*, 2001). O ciclo inicia-se na fase anagênica, com duração de 2 a 6 anos. Esta fase é caracterizada por divisões celulares de queratinócitos no bulbo capilar, que produzem várias camadas de queratina, direcionando o fio de cabelo para o exterior do couro cabeludo (Novak *et al*, 2009). O alto nível de DHT presente na AAG é um dos fatores responsáveis pela queda de cabelo, promovendo a miniaturização folicular na fase anagênica (Cotsareli *et al*, 2001). Ao terminar a primeira fase, o folículo capilar recebe um sinal para iniciar a fase catagênica (de descanso), que dura cerca de 3 semanas. Nesta fase cessa-se a proliferação na matriz, e o folículo libera a papila dérmica, rica em fibroblastos e fatores de crescimento. Embora seja desconhecido, tem sido sugerido o envolvimento do fator de crescimento de fibroblastos-5 (FGF-5) na sinalização da transição da fase anagênica para catagênica (Shapiro *et al*, 2004). A fase seguinte é chamada fase telogênica (de involução), em que células epiteliais são projetadas para cima e formam o chamado grupo germinativo secundário de

cabelos. Em algum ponto nesta fase, este grupo produz uma sinalização química para que aconteça migração de células tronco transcricionalmente ativas para sua proximidade. As células germinativas proliferam-se para baixo, formando assim, um novo bulbo capilar, que reinicia a fase anagênica. Estudos sugerem que a transição da fase telogênica para fase anagênica e, portanto, recomeço do ciclo, depende de alguns fatores de crescimento, tais como BMP (*bone morphogenetic proteins*, derivado do TGF- β), e do fator de crescimento de fibroblastos-7 (FGF-7) (Shapiro *et al*, 2004).

Na AAG, o tempo de latência entre a fase telogênica e a nova fase anagênica é prolongado, portanto, os fios de cabelo que caem naturalmente demoram muito mais tempo para serem repostos (Headigton, 1993, Whiting, 1993). Ocorre também na fase telogênica, o desprendimento capilar do folículo (Shapiro *et al*, 2004, Novak *et al*, 2009). Este processo possui um mecanismo tão complexo que foi proposta a criação de uma nova fase do ciclo de crescimento celular, denominada fase exogênica. (Milner *et al* 2002, Stenn, 2005). Esta fase foi considerada uma etapa independente do ciclo capilar, pois acredita-se que o folículo capilar seja renovado por mais de um ciclo de crescimento (Rook *et al*, 1982). A fase exogênica ocorre desde a sinalização para o desprendimento do fio capilar até o desprendimento total, mas o início desta fase pode variar de acordo com o tipo do folículo e sua localização (Choung *et al*, 1998). Na AAG, foi constatado que o fio cai bem antes do início da fase anagênica, ou seja, antes de ser repostado outro fio, mas ainda não foi demonstrado se isto ocorre devido ao prolongamento da fase telogênica, ou ao início prematuro da fase exogênica (Stenn *et al*, 2001). O ciclo do crescimento capilar é um processo assíncrono, ou seja, cada folículo faz seu próprio ciclo independente dos folículos adjacentes. (Choung *et al*, 1998).

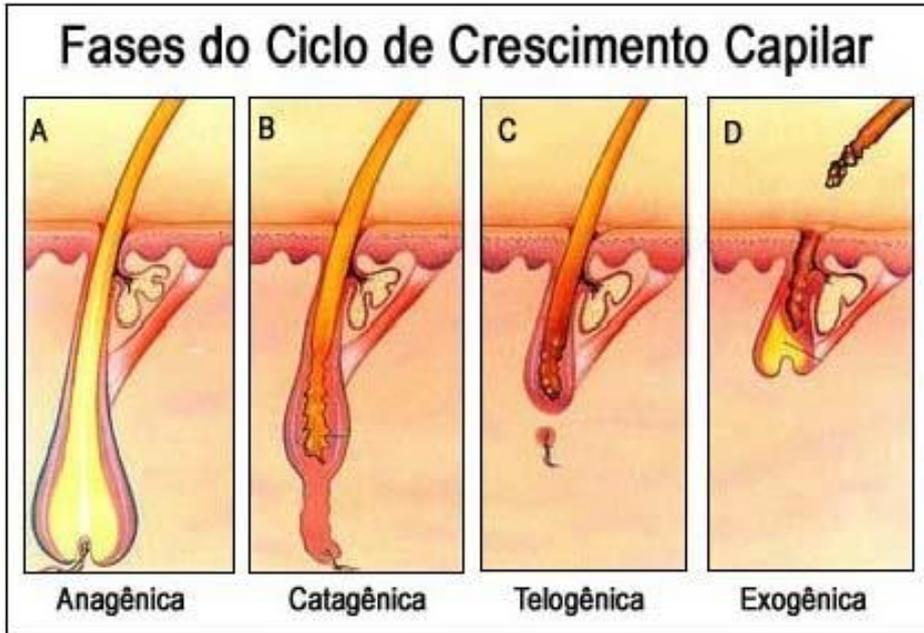


Figura 1: Esquema das 4 fases do ciclo de crescimento capilar. (A) fase anagênica: crescimento do folículo e do fio de cabelo; (B) fase catagênica: involução folicular; (C) fase telogênica: início do desprendimento e formação de novo folículo; (D) fase exogênica: desprendimento total do fio. Adaptado de Sinclair R (2004).

O crescimento capilar é controlado por diversas interações bioquímicas epitelial-mesenquimal, tais como a presença de fatores de crescimento e moléculas de adesão (figura 2) (Choung *et al*, 1998). Logo na fase embrionária do folículo já é possível observar uma rede de moléculas expressas. Choung *et al* (1998) propuseram que a expressão do receptor do fator de crescimento transformador β II (TGF- β II) na epiderme indica um sítio de desenvolvimento de um placódio (estrutura primordial para desenvolvimento embrionário), e formação de um futuro folículo capilar. A expressão do receptor de TGF- β II, junto a outros de fatores de crescimento da família FGF (-1, -2 e -4), induzem a expressão da proteína *Sonic hedgehog* (Shh), essencial para desenvolvimento embrionário e diferenciação celular. A Shh é responsável pela indução da expressão de TGF- β I, BMP-2 e BMP-4

que, por sua vez, estimulam a formação da papila dérmica. Recentemente, Panchaprateep *et al* (2013) demonstraram que o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), produzido nas células mesenquimais da papila dérmica, e as proteínas às quais se liga (IGFBP-2 e -4) são reguladores do ciclo de crescimento capilar, pois mantêm o folículo na fase anagênica. Por possuir esta característica, o IGF-1 tem sido considerado promissor no tratamento da AAG. Takura *et al* (1996) mostraram que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está envolvido na formação mesenquimal da derme, e também na formação do canal capilar. Yano *et al* (2001) identificaram o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como o principal mediador do ciclo do crescimento capilar ao provar que a revascularização promove o crescimento capilar e aumenta o tamanho do folículo.

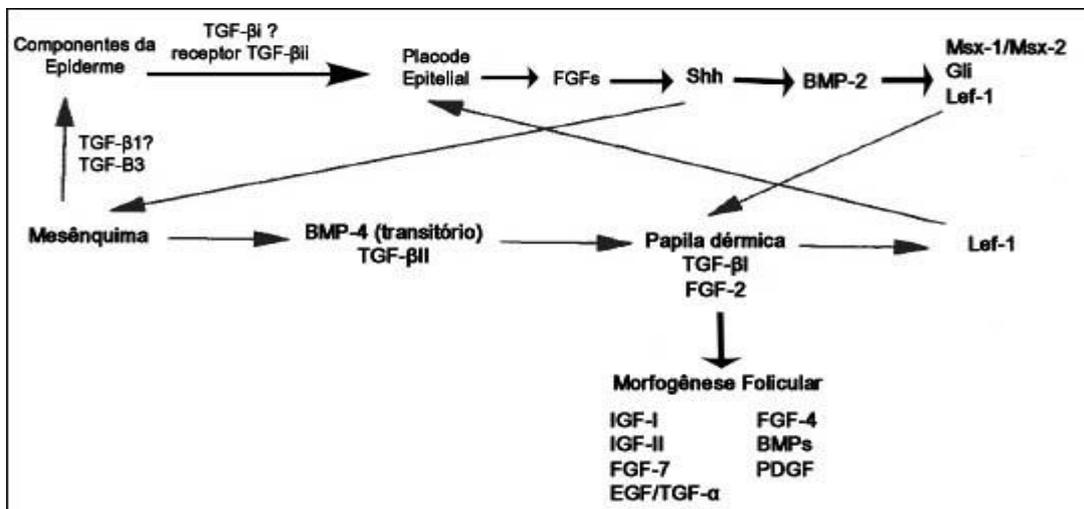


Figura 2: Interações biomoleculares presentes no desenvolvimento folicular e reguladores do ciclo de crescimento capilar. Adaptado de Choung 2.

Apesar do ciclo acontecer durante a vida toda, há um fenômeno fisiológico irreversível chamado de deleção programada do órgão (POD,

programmed organ deletion), em que determinados folículos param de realizar o ciclo de crescimento permanentemente. Esta deleção, restrita a certo ponto da fase anagênica e catagênica, ocorre devido a um processo inflamatório em que células do sistema imunológico, geralmente macrófagos ativados e linfócitos TCD4+, que apresentam complexos de histocompatibilidade maior classe II (MHC-II) e expressam a molécula de adesão intercelular 2 (ICAM-2) na fase catagênica, lesionam a região epitelial perifolicular, rica em células tronco (Stenn *et al*, 2001, Muller-Rover *et al*, 2000, Eichmuller *et al*, 1998). Esse fenômeno fisiológico pode estar associado à AAG, pois, mesmo não apresentando perda permanente de folículos, nota-se um infiltrado perifolicular de células inflamatórias (Stenn *et al*, 2001).

1.3 Fisiopatologia

O desenvolvimento e a progressão da AAG são resultados da ação de hormônios andrógenos no couro cabelo: a testosterona é convertida em DHT pela enzima 5- α -redutase tipo II, altamente expressa nas regiões acometidas pela AAG (Inui *et al*, 2011). A DHT liga-se a receptores androgênicos (RA) e juntos formam o complexo DHT-RA. Após a ligação, ocorre a dimerização deste complexo, que é translocado ao núcleo, onde é feita a transcrição de genes responsáveis por alterações no ciclo de crescimento. Após sucessivas passagens, a duração da fase anagênica é diminuída em cerca de 7 vezes, e, da fase telogênica, é aumentada (Inui *et al* 2011, Whiting, 1993). A duração da fase anagênica determina o comprimento do fio, portanto, após certo tempo, o novo fio de cabelo não é comprido o suficiente para alcançar a superfície dérmica, e o único sinal da presença do folículo é um simples poro no couro cabeludo. Isto leva a uma redução do número de

cabelos no couro cabeludo, caracterizando a alopecia (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Devido ao fio ser menos preso ao folículo na fase catagênica, há uma maior facilidade de desprendimento ao lavar ou pentear o cabelo (Sinclair, 1998). Uma possível explicação para esta alteração no ciclo de crescimento é que a papila dérmica, fundamental para a manutenção do ciclo, por conter receptores androgênicos, seja um dos principais alvos para ação do DHT (Inui *et al*, 2011, Ellis *et al*, 2002, Cotsarelis *et al*, 2001, Kaufman, 1996).

A miniaturização folicular característica da AAG também ocorre por influência do DHT (figura 3), porém este mecanismo também é desconhecido. O processo de miniaturização é gradual e passa a acontecer em algum momento na fase anagênica, em que há uma redução do tamanho do folículo após sucessivas passagens do ciclo de crescimento (Sinclair, 1998).

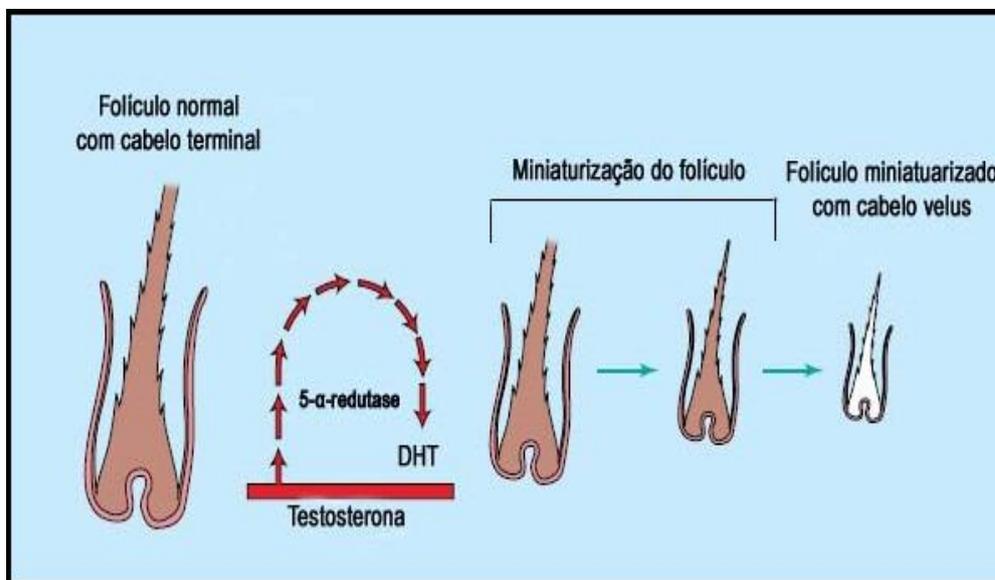


Figura 3: Processo de miniaturização do folículo na presença de maior quantidade de DHT. Folículo normal com cabelo terminal sofre miniaturização após entrar em contato com hormônio androgênico DHT, resultado da

conversão da testosterona pela enzima 5- α -redutase. O final deste processo é um folículo pequeno com fio velus, pequeno e sem pigmentação. Adaptado de Sinclair, 1998.

A exata herança genética da AAG também é desconhecida. Alguns trabalhos indicam que esta herança seja autossômica, sendo dominante para homens e recessivo para mulheres, sugerindo que um único gene seja responsável pela predisposição (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Por outro lado, devido aos diversos fenótipos de AAG, que vão desde um couro cabeludo normal até a calvície completa, sugere-se que a herança seja poligênica (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Uma pessoa jovem pode não apresentar nenhum sinal da alopecia, mas pode ter predisposição genética para AAG, e desenvolvê-la tardiamente. Esse fato dificulta a identificação dos genes envolvidos na AAG, pois um indivíduo considerado normal na comparação com um indivíduo já com a doença instalada pode ter uma mutação que resultará ou não no desenvolvimento da AAG (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Inicialmente, os genes alvo foram os relacionados à alta expressão da 5- α -redutase (SRD5A1 e SRD5A2), mas foi constatado que não há correlação com a AAG (Ellis *et al*, 1998, Sreekumar *et al*, 1999). Em um estudo clínico, Ellis *et al* (2001) observaram uma diferença significativa na sequência do gene transcritor de RA de pessoas com e sem AAG, mas estas alterações genéticas não são consideradas como fator etiológico para o desenvolvimento da alopecia. Na AAG, nota-se também uma diminuição da expressão do gene transcritor da enzima aromatase (CYP19) no couro cabelo, responsável pela conversão de androgênios em estrogênios. A expressão dessa enzima poderia evitar o desenvolvimento da AAG ao inibir a ação

da 5- α -redutase, mas sua correlação com AAG foi descartada nesse mesmo estudo (Ellis *et al*, 2001).

1.4 Classificação e Avaliação da AAG

Por se tratar de uma queda padrão de cabelo, a AAG é classificada de acordo com a escala Norwood-Hamilton (figura 4). Esta escala é dividida em sete categorias: I) sem queda de cabelo; II) mínimo recesso bifrontal; IIA) avanço na progressão do recesso na região frontal; III) médio recesso na região frontal; IIIA) recesso significativo na região frontal; III vértice): recesso significativo na região frontal com mínima queda de cabelo na região do vértice craniano; IV-VI) progressão do recesso da região frontal e vértice, VII) há cabelo apenas na região occipital (Norwood, 1975).

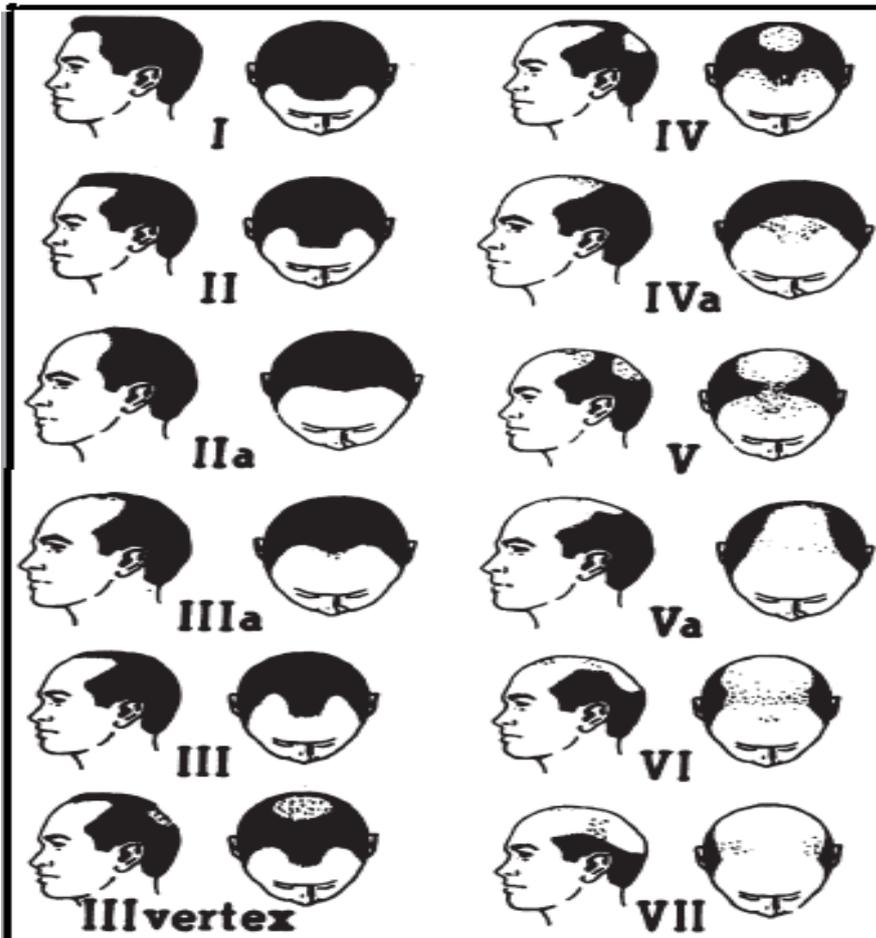


Figura 4: Escala Norwood-Hamilton para classificação de alopecia androgenética.

Adaptado de Norwood, 1975

Apesar de normalmente ter início tardio, a AAG pode desenvolver-se logo após a puberdade, e cerca de 60% de homens caucasianos podem apresentar calvície grau VII até os 70 anos (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

Além da queda de cabelo, os sinais iniciais de AAG podem ser prurido e/ou tricodinia. Por serem sintomas presentes em vários outros distúrbios capilares, é necessário fazer uma análise de antecedentes pessoais de no mínimo 3 meses antes do início da queda de cabelo, para exclusão de fatores associados às outras causas, como ingestão de medicamentos e, em mulheres, a presença de distúrbios hormonais (Blume-Peytavi *et al*, 2011, Gordon *et al*, 2011, Tosti *et al*, 2009). Nesta

pesquisa é preciso saber se a queda de cabelo é contínua ou intermitente. Pacientes com AAG geralmente relatam uma perda de cabelo lenta e progressiva, caracterizando-a como crônica. Também é importante determinar se há o afinamento do cabelo, que ocorre tipicamente na região frontal, parietal, ou no vértice craniano. Por se tratar de uma herança genética, é de extrema relevância fazer um levantamento da história familiar para pesquisar a presença de qualquer tipo de anormalidade capilar, como alopecia areata, hirsutismo, e a própria AAG. Um resultado negativo no histórico familiar não exclui a possibilidade de desenvolvimento futuro de AAG (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

Para um melhor diagnóstico da AAG, também é necessário excluir doenças sistêmicas ou agudas diagnosticadas dentro de um ano antes dos primeiros sinais da perda de cabelo. Infecção grave, deficiência de ferro, ou disfunção da tireoide podem causar queda de cabelo, mas não AAG (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

Alguns medicamentos também causam a queda de cabelo, e uma história detalhada, enfatizando o uso de quimioterápicos e hormônios pró-androgênicos ou antitireoidianos deve ser realizada. Deve-se pesquisar, também, o uso de esteroides anabolizantes ou andrógenos suplementares, especialmente em pacientes homens (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

Além destas pesquisas, o estilo de vida do paciente também deve ser investigado. Penteados especiais podem gerar tração no fio de cabelo, facilitando sua queda, e exposição exagerada à radiação ultravioleta pode estar ligada à queda de cabelo (Blume-Peytavi *et al*, 2011). Su *et al* (2007) relataram uma associação entre tabagismo e o desenvolvimento de AAG moderada a grave em pacientes do gênero masculino.

Apesar da maioria das mulheres com AAG ter funções hormonais normais, é necessário realizar uma pesquisa da história clínica detalhada para excluir alterações hormonais que causem queda de cabelo, ou outras doenças, como tumor hormônio-sensível. Essa história ginecológica inclui: menarca, ciclo menstrual, menopausa, amenorreia, uso de hormônios contraceptivos, terapia de reposição hormonal, tratamento de fertilidade, número e o tempo da última de gravidez e parto, abortos, cirurgias ginecológicas, crescimento excessivo de pêlos em rosto e corpo, e presença de acne ou seborreia na pele ou no couro cabeludo (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

O *European Consensus Group* desenvolveu um algoritmo para facilitar o diagnóstico de AAG (figura 5) (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

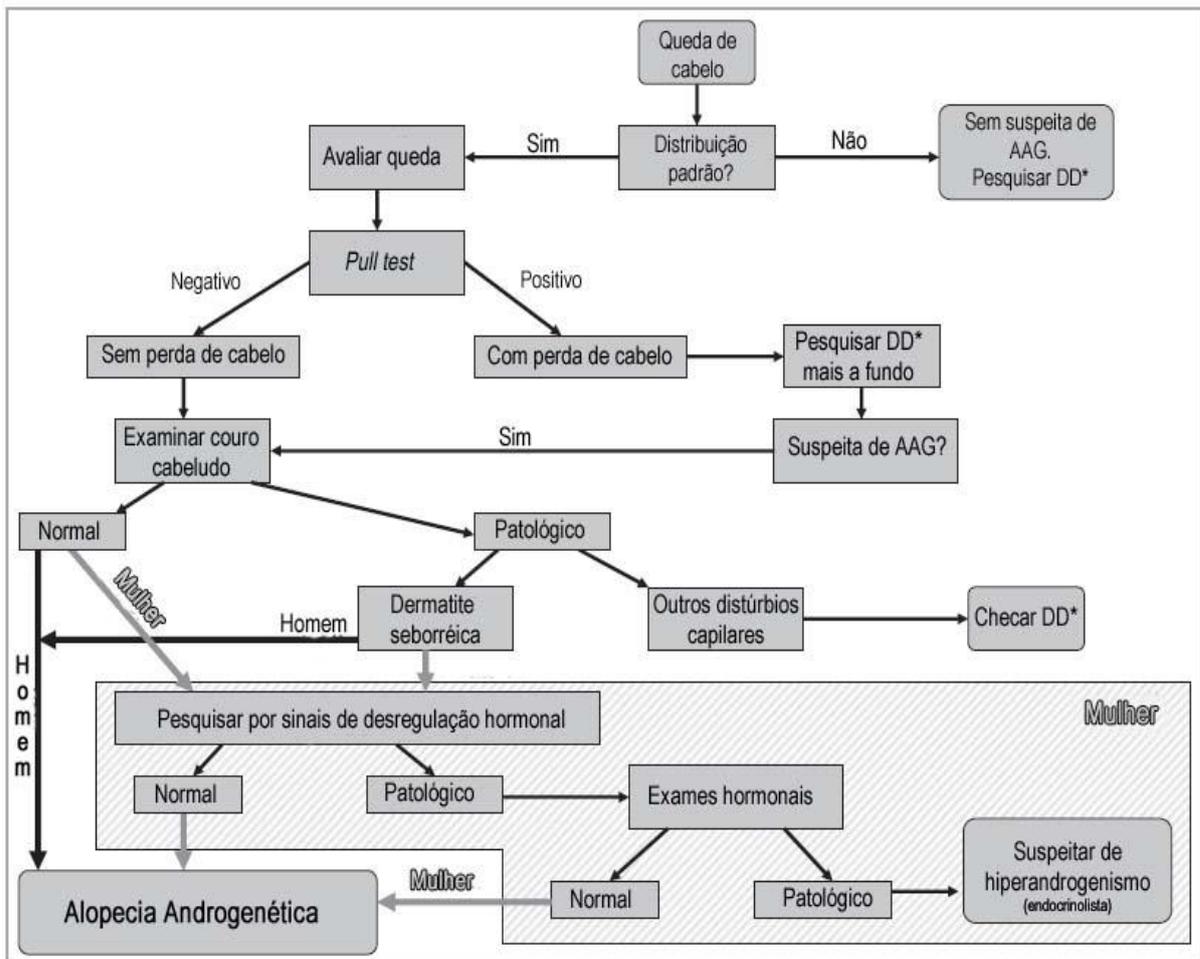


Figura 5: Algoritmo criado pelo *European Consensus Group* para facilitar o diagnóstico de AAG durante a rotina clínica. Adaptado de Blume-Peytavi *et al*, 2011. DD*: diagnóstico diferencial.

1.5 Diagnóstico da AAG

1.5.1 Pull Test

O *pull test* é um exame indicativo inicial de fácil realização. Com os dedos polegar, indicador e médio puxam-se cerca de 50-60 fios de cabelo nas regiões parietal de ambos os lados, frontal e occipital. A positividade do teste se dá quando mais de 10% dos cabelos se desprendem do couro cabeludo. Este desprendimento é devido à alteração do ciclo de crescimento capilar, em que há aumento do tempo

da fase telogênica, portanto, os fios de cabelo estão pouco presos ao folículo. Este teste geralmente é negativo para pacientes com AAG não sintomática, mas se torna positivo na fase ativa, quando há aumento do número de cabelos que se encontram na fase telogênica (Hillmann *et al*, 2009).

O *pull test* apresenta grande variação interobservador, e também pode ser influenciado pelo jeito que o paciente lava e penteia o cabelo (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

1.5.2 Dermatoscopia

A dermatoscopia é um método não invasivo para análise do couro cabeludo e da pele. Esta técnica é feita com uma lupa e pode ser conciliada com vídeo (videodermatoscopia). A amplificação feita pela lupa permite observar o eixo capilar no folículo (se presente), seu tamanho e a variação na densidade capilar. Com o uso deste método, é possível observar halos marrons em volta da abertura folicular (figura 5), característica da AAG (Blume-Peytavi *et al*, 2011, Tosti *et al*, 2009).



Figura 6: Presença de halos marrons em volta da abertura folicular, aparência de couro cabeludo típica de AAG.

1.5.3 Tricograma

O tricograma é um método bem útil para distinguir os diferentes tipos de queda de cabelo. A técnica consiste na retirada de cerca de 80 fios de cabelo com *forcéps* de borracha, para análise microscópica das raízes capilares. Para realizar esta análise microscópica, os bulbos capilares dos fios arrancados são imediatamente colocados em uma lâmina de vidro em um meio de fixação para análise futura. Além da dor na hora da retirada dos fios, o paciente precisa ficar 5 dias sem lavar o cabelo, o que causa desconforto. O uso do tricograma é mais aconselhável quando é necessário fazer análise da raiz capilar, como, por exemplo, no diagnóstico da síndrome da anágena solta (Hillmann *et al*, 2009, Blume-Peytavi *et al*, 2011)

1.5.4 Trichoscan

TrichoScan é um método não invasivo de avaliação capilar que consiste em análise feita por microscopia de epiluminescência padrão. A técnica é realizada na área de transição entre cabelos normais e área calva. O método de *TrichoScan* é eficiente na avaliação da densidade capilar, diâmetro capilar, taxa de crescimento capilar e taxa de relação entre cabelos velus/terminal. Utilizando-se um *software* específico de análise das imagens são avaliados os seguintes parâmetros: seleção do componente da cor (ajuda na visualização dos fios), rejeição de artefatos (bolhas e reflexos), determinação do limiar da queda de cabelo, identificação de regiões

capilares, análise de cada fibra capilar, cálculo do número, densidade e espessura dos fios (Huffmann, 2005).

1.5.5 Biópsia

A biópsia do couro cabeludo é essencial para o diagnóstico de alopecia cicatricial, mas no caso de AAG, é indicada apenas quando há dúvidas no diagnóstico. Nesta técnica, são feitos dois cortes de 4 mm, profundos o suficiente para atingir a gordura subcutânea, região onde são encontrados os bulbos capilares na fase anagênica. Um destes cortes é feito verticalmente (corte convencional de biópsia), e outro, horizontalmente. O corte horizontal permite avaliar o número de folículos, o diâmetro, a característica do agrupamento, e sua morfologia (Sinclair *et al*, 2003, Elston *et al*, 1995, Whiting, 1993). Na AAG há um aumento no número e proporção de folículos miniaturizados: em áreas afetadas, a proporção de folículos de cabelo velus por cabelo terminal é de 3:1, enquanto que em regiões normais, essa proporção é de 1:7 (Whiting, 1993). Já no corte vertical, é possível observar a infiltração primária perifolicular de linfócitos e fibrose perifolicular (Olsen, 2008). Os cortes de biópsias não devem ser feitos na região bitemporal, pois esta região apresenta miniaturização folicular independente da presença de AAG (Blume-Peytavi *et al*, 2011).

1.6 Tratamentos

Devido à sua natureza progressiva, o tratamento de AAG deve ser iniciado precocemente, e ser continuado por um longo período de tempo para manter a eficácia (Gordon *et al*, 2011). Os fármacos disponíveis e aprovados pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) e pela ANVISA (Agência Nacional de

Vigilância Sanitária) são: uso tópico de minoxidil 2% para mulher e 5% para homens, e a administração oral (1 mg/dia) de finasterida, inibidor da enzima 5- α -redutase tipo II) somente para homens (Olsen *et al*, 2005). Além do uso de fármacos, o implante capilar autólogo é um processo alternativo bem comum no tratamento de AAG.

1.6.1 Minoxidil

O minoxidil foi inicialmente usado para o tratamento de hipertensão devido à sua característica vasodilatadora. Em uma pesquisa com esta finalidade, Devine *et al* (1977) relataram hirsutismo como efeito colateral do tratamento. Este relato levou ao desenvolvimento de uma formulação tópica de solução de minoxidil com a função de deter a progressão da perda capilar e promover o crescimento capilar (Sinclair, 1998). O minoxidil promove um aumento do tempo da duração da fase anagênica, e ampliação dos folículos miniaturizados (Prince, 1999).

A solução de minoxidil deve ser aplicada duas vezes ao dia no couro cabeludo. Os primeiros efeitos da diminuição da queda de cabelo e sua estabilização acontecem em até 8 semanas após o início do tratamento e, posteriormente inicia-se o crescimento capilar. Por não inibir o processo biológico, estes fios tendem a ter um ciclo de crescimento diminuído, e rapidamente voltam a cair (Mulinari-Brenner *et al*, 2009, Sinclair, 1998).

Os efeitos colaterais do uso de minoxidil são, em sua maioria, dermatológicos: cerca de 7% dos pacientes que fazem uso de solução de minoxidil 2% apresentam quadro de irritação do couro cabeludo junto com escamação e prurido. Em pacientes que fazem uso da solução de minoxidil 5%, esta incidência aumenta devido à alta concentração de propilenoglicol. Outro efeito colateral é a hipertricose, mais comum em mulheres e rara em homens (Sinclair, 1998).

1.6.2 Finasterida

A finasterida é um inibidor competitivo da enzima 5- α -redutase tipo II e seu uso impede a conversão da testosterona em DHT (Sinclair, 1998). O uso deste fármaco para o tratamento de AAG foi proposto devido à ausência da doença em homens que apresentam deficiência desta enzima. Por se tratar de um fármaco que atua em hormônios andrógenos, o uso da finasterida também é indicado para o tratamento de hipertrofia prostática, porém na dose de 5 mg, enquanto que para o tratamento de AAG, o indicado é 1 mg (Weide, 2009).

O uso oral de finasterida 1 mg tem sido um potente tratamento para impedir a progressão de AAG. Após um ano de uso, observa-se cerca de 25% de crescimento de novos fios de cabelo, e depois de dois anos, ocorre um aumento do diâmetro capilar (Mulinari-Brenner *et al*, 2009, Sinclair, 2001). A eficácia é observada após 4 meses de tratamento, porém, os pacientes devem fazer uso por no mínimo 24 meses, e, se neste período esses efeitos se mantiverem o uso deve ser contínuo (Sinclair, 1998). Este medicamento não deve ser utilizado em mulheres, e não deve ser manipulado por gestantes, pelo risco de absorção e alterações do feto.

Os efeitos colaterais do uso da finasterida são: diminuição da libido (1,8%), disfunção erétil (1,3%) e diminuição do volume de ejaculação (1,2%) (Weide, 2009). Após 3 anos do lançamento foi incluído na bula do medicamento, por indicação do FDA, um alerta sobre a continuidade de alguns desses efeitos colaterais, mesmo após a suspensão do medicamento. Como o número de usuários é muito grande, incluindo a população jovem, esse alerta não é desprezível do ponto de vista prático.

1.6.3 Implante Capilar Autólogo

No implante capilar são retirados folículos de regiões onde não ocorre AAG (regiões lateral e posterior), e são implantados nas regiões acometidas. Estes folículos retirados não são geneticamente propensos a desenvolver AAG, característica que permanece mesmo quando são inseridos em regiões já calvas. Além da possibilidade de resultar em uma aparência artificial, a área doadora pode ser insuficiente para a realização deste procedimento (Gadelha *et al*, 2003). Outra desvantagem desta técnica é a possibilidade que alguns folículos não germinem devido à necrose, apoptose e consequente absorção pelo couro cabeludo (Uebel *et al*, 2006).

1.6.4 Outros Tratamentos

No Brasil, há outros tratamentos comercialmente disponíveis que possuem determinados princípios ativos, tais como o 17- α -estradiol e derivados da planta *Serenoa serrulata*, porém com pouca evidência clínica (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Um estudo *in vitro* com a utilização de 17- α -estradiol demonstrou uma redução da conversão de testosterona em DHT e aumento da conversão da testosterona em outros esteroides, com menor participação no desenvolvimento da AAG, como estrona e androstenediona (Mulinari-Brenner *et al*, 2009). Em um estudo clínico, duplo-cego, feito somente com mulheres que usaram 17- α -estradiol e minoxidil 2%, notou-se melhora da densidade capilar sem evolução da doença (Blume-Peytavi *et al*, 2005).

Derivados da planta *Serenoa serrulata* sugerem uma inibição da enzima 5- α -redutase e têm sido usados para o tratamento de hiperplasia prostática; portanto, é possível que tenha um efeito na AAG (Mulinari-Brenner *et al*, 2009).

1.7 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Apesar dos tratamentos atuais disponíveis prevenirem a queda e promoverem o crescimento temporário do cabelo, eles não são tão eficientes para regeneração do folículo capilar em áreas já calvas do couro cabeludo. Além disso, mesmo que não muito frequentes, os efeitos colaterais são bastante indesejáveis, particularmente com o uso da finasterida (Miteva *et al*, 2012).

O PRP é um produto autólogo, que resulta em um pequeno volume de plasma concentrado em plaquetas, que, através da degranulação dos grânulos- α , secretam fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento epidermal (EGF), PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, e FGF (Miao *et al*, 2013). Por se tratar de um produto autólogo, não apresenta os riscos relacionados a um produto biológico heterólogo.

O PRP atraiu atenção na área da cirurgia plástica e da dermatologia devido ao seu potencial efeito como adjuvante nas cirurgias plásticas de face, efeitos estéticos e rejuvenescedores da pele. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o PRP aumenta a proliferação de fibroblastos dérmicos e células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo, enquanto relato de casos recentes descrevem o uso do PRP para o tratamento de cicatrizes de acne e do sulco nasolabiais (Azzena *et al*, 2008, Kakudo *et al*, 2008, Cervelli *et al*, 2009, Sclafani *et al*, 2009, Cho *et al*, 2011).

Os fatores de crescimento, também chamados de citocinas, são polipeptídeos que atuam como mediadores da maturação e da diferenciação celular, auxiliando na reparação tecidual e angiogênese (Weinberg *et al*, 1990, Vick *et al*, 2006). Os principais fatores de crescimento do PRP que podem ter um papel terapêutico na AAG são:

a) *PDGF*: devido à ação mitogênica, é uma das moléculas mais importantes envolvidas na proliferação celular de fibroblastos e do tecido conjuntivo. Sua ação

cicatrizante ocorre pela característica de estimular a síntese de colágeno na reparação de feridas e de perdas de substância tecidual (Uebel *et al*, 2006). No folículo capilar, o PDGF é responsável pelas diversas mitoses que ocorrem na região do *bulge* e da papila dérmica, e também pela reepitelização após lesão e/ou perda tecidual (Karlsson *et al*, 1999, Kamp *et al*, 2003);

b) *TGF-β*: tem ação reparadora e anti-inflamatória em lesões de tecido. No folículo capilar, o TGF-β estimula o crescimento de células mesenquimais na papila dérmica, mas em alta concentração atua como *feedback* negativo, inibindo a proliferação de células epiteliais (Stenn *et al*, 2001, Roberts *et al*, 1985);

c) *EGF*: é responsável pela estimulação de mitose em células epiteliais e fibroblastos e, por razões desconhecidas, aumenta a taxa de folículos na fase anagênica, ao inibir o início da fase catagênica (Mak *et al*, 2006). A presença de EGF orienta e alonga o folículo. Isso ocorre devido à proliferação dos queratinócitos basais (Amgar *et al*, 2013). Mak *et al* (2006) propuseram o EGF como um dos principais reguladores do ciclo do crescimento capilar, pois suas concentrações podem controlar o início ou fim da fase anagênica;

d) *VEGF*: está envolvido com a interação vascular-endotelial, tendo assim, uma importante ação na permeabilidade vascular e na angiogênese, processo crítico para reparação tecidual. O VEGF tem quimiotaxia por fibroblastos e os atrai para o tecido conjuntivo, produzindo colágeno, indispensável para a matriz, que suporta as células endoteliais e fibroblastos (Iruela-Arispe *et al*, 1997, Dvorak *et al*, 1987);

e) *IGF-1*: este fator, além de regular o ciclo de crescimento capilar ao alterar a duração da fase anagênica, emite sinais mitóticos em diferentes linhagens celulares e atua na proteção à apoptose ao regular a expressão de sinais antiapoptóticos.

O uso de PRP autólogo elimina o potencial de transmissão de doenças e imunogenicidade no receptor. No entanto, a preparação requer tempo para processar o sangue, e suas células apresentam uma curta meia-vida, devendo ser aplicado poucas horas após a sua produção (McCarrel *et al*, 2009). Devido a isto, o processo de liofilização do PRP surge como uma possibilidade muito interessante na prática clínica. Estudos com utilização de PRP liofilizado em enxerto ósseo demonstraram resultados promissores (Pietramaggiore *et al*, 2006, Markou *et al*, 2009), devido ao potencial em concentrar plaquetas e fatores de crescimento, mesmo sendo armazenado por diversas semanas após seu preparo (Pan, 2016).

1.7.1 Uso De PRP Na AAG

A eficácia do uso de PRP no tratamento de AAG pode estar relacionada à presença dos fatores de crescimento tanto na fase embrionária quanto adulta do folículo capilar (McElwee *et al*, 2000, Perez-Meza *et al*, 2004). Na fase embrionária, a ação do PDGF, TGF- β e VEGF ocorre na formação do broto capilar, ligando as células epiteliais às células de origem mesenquimal. A formação da papila dérmica também é influenciada pela presença de TGF- β e VEGF (Kamp *et al*, 2003). Já na fase adulta, estes mesmos fatores agem no crescimento e na manutenção do folículo: o PDGF estimula mitoses de células tronco, o VEGF favorece o desenvolvimento da microcirculação, e o TGF- β ativa a papila dérmica e inibe apoptoses durante o ciclo celular. Durante a transição da fase anagênica para a catagênica, há o aumento de comunicação neuro-imunológica, levando a uma inflamação neurogênica perifolicular e apoptose no folículo (Amgar *et al*, 2013).

À medida que os fatores de crescimento se ligam ao seu receptor correspondente na membrana celular, é induzida uma cascata de sinalização que

ativa reguladores antiapoptóticos, tais como a proteína quinase B (Akt) e Bcl-2 (34, 49-51). Li *et al* (2012), ao relatarem um aumento *in vitro* de Bcl-2 e Akt ativado em resposta ao PRP, apoiaram a hipótese de que o PRP ativado possa restaurar a sobrevivência das células da papila dérmica.

O IGF-1 tem sido considerado um fator de crescimento importante em vários sistemas biológicos (Jones *et al*, 1995). Foi sugerido que o IGF-1 participa na migração e proliferação celular durante o desenvolvimento dos folículos capilares, uma vez que a ligação do IGF-1 ao seu receptor (IGF-1R) ativa o receptor tirosina quinase (RTK) que estimula a divisão celular (Ullrich *et al*, 1990, Peus *et al*, 1996, Stenn *et al*, 1996). Por conseguinte, a inibição do IGF-1 pode facilitar a progressão da perda de cabelo. Essa hipótese foi reforçada por um estudo feito por Zhao *et al* (2011) em modelo experimental, que mostrou que a diminuição dos níveis de IGF-1 pela ação da DHT na papila dérmica promoveu a perda de pêlos em camundongos.

Junto aos fatores de crescimento, as vias de sinalização de quinase regulada por sinal extracelular (ERK, de *extracellular signal-regulated kinase*) e Akt podem representar uma papel-chave na sinalização necessária para a expressão gênica do crescimento capilar (Stenn *et al*, 1996, Zhao *et al*, 2011). Um estudo relatou um aumento *in vitro* dos níveis de ERK à medida que as células da papila dérmica também aumentaram (Li *et al*, 2012). No mesmo estudo, observou-se um aumento significativo na expressão do FGF-7 e de β -catenina em células da papila dérmica de ratos.

A via *canonical wingless* (Wnt) induz o acúmulo de β -catenina no citoplasma, que por sua vez é translocado para o núcleo e atua como cofator de transcrição, promovendo alterações na expressão gênica (Chesire *et al*, 2002, Pawlowski *et al*, 2002, Kwack *et al*, 2008, Gupta *et al*, 2016). Em um folículo regular,

os fatores de crescimento ajudam na proliferação e na indução da via de sinalização das células da papila dérmica. Os fatores de crescimento presentes no PRP podem induzir a produção de Akt, impedindo a apoptose e estimulando o acúmulo citoplasmático de β -catenina (Gupta *et al*, 2016)

O uso clínico do PRP na AAG tem sido estudado por vários autores (tabela 1). Embora nenhum deles tenha correlacionado diretamente a contagem de plaquetas e as concentrações de fatores de crescimento com a resposta obtida, os estudos sugerem o PRP como um tratamento alternativo promissor para a AAG (Takikawa *et al*, 2011, Cervelli *et al*, 2014, Li *et al*, 2012, Alves *et al*, 2016, Mapar *et al*, 2016, Schiavone *et al*, 2014).

Apenas um estudo realizou a dosagem dos fatores de crescimento no PRP, mas sem uma análise de correlação com o resultado clínico (Takikawa *et al*, 2011). O objetivo dessa dosagem foi avaliar a mobilização, e liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento do PRP na presença de micropartículas de deltaparina e protamina.

Cervelli *et al* (2014) utilizaram PRP em 10 pacientes homens e, através do *TrichoScan*, observaram aumento de 18 novos fios de cabelo, e aumento na densidade de 27,7 fios/cm², três meses após o procedimento. As biópsias do couro cabeludo mostraram um aumento significativo do número de folículos e da espessura da epiderme ($p < 0,005$ para ambos).

Alvez *et al* (2016) avaliaram parâmetros de crescimento capilar após 3 aplicações de PRP em 22 pacientes (11 homens e 11 mulheres) com AAG, e após 6 meses de seguimento, observaram um aumento estatisticamente significativo de todos os parâmetros avaliados pelo *TrichoScan*.

Navarro *et al* (2015) estudaram o PRGF (plasma rico em fatores de crescimento) sem leucócitos em 100 indivíduos, sendo 50 homens e 50 mulheres. Através de fotos globais e tricograma, os autores relataram que o tratamento aumentou significativamente o número de fios e a porcentagem de fios anagênicos. Este resultado foi observado em ambos os sexos, porém as mulheres tiveram uma resposta levemente melhor. Os pacientes relataram também uma melhora na densidade capilar.

Mapar *et al* (2016) avaliaram 17 homens que apresentavam grau de AAG entre IV e VI que foram tratados com PRP preparado utilizando-se um *kit* comercial. O método de avaliação neste estudo foi feito com lupa, e demonstrou diminuição dos fios terminal e *velus*. Uma limitação citada pelos autores foi o grau mais avançado de AAG, em relação a outros estudos publicados.

AUTOR	NÚMERO DE PACIENTES	GRAU DE AAG*	TIPO DE PRP	Número de aplicações	AVALIAÇÃO	Follow up	RESULTADOS
Takikawa M <i>et al</i> , 2011	26 (16 homens e 10 mulheres)	N/I	L-PRP (associado a D/P MP)	5 Quinzenais	Tricograma e biópsia	4 meses	1) Média de aumento de 15,0 fios e $2,9 \times 10^4$ mm ² em diâmetro
Cervelli V <i>et al</i> , 2014	10 (homens)	II – IV	AA-PRP	N/I	TrichoScan e biópsia	3 meses	1) Média de aumento de 18,0 fios em três meses. 2) Aumento de 27,7 fios/cm ² de densidade em três meses 3) Aumento do número de folículos (p < 0,05) 4) Aumento da espessura da epiderme (p < 0,005)
Li Z <i>et al</i> , 2012	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	---	L-PRP	---	Cultura celular	---	1) PRP induz a proliferação de células da papila dérmica 2) PRP aumenta a fosforilação de quinases reguladas por sinal extracelular e a expressão de Akt e Bcl-2 3) PRP aumenta a atividade da β -catenina e a expressão de FGF-7 4) PRP estimulou o crescimento de pelos em ratos

Schiavone G <i>et al</i> , 2014	64 (42 homens e 22 mulheres)	N/I	L-PRP	2 Trimestrais	Fotos globais Escala Jaeschke	6 meses	1) Média de melhora clínica de 3,5 (95%CI, 2.9–3.5) em 54,7% dos pacientes
Alves R <i>et al</i> , 2016	22 (11 homens e 11 mulheres)	II-V Classificação de Ludwig: I-III	P-PRP	3 Mensais	Fotos globais Fototricograma	6 meses	1) Aumento significativo de fios anagênicos, densidade capilar e fios terminais ($p < 0,05$) 2) Discreto aumento de número de fios (2,4)
Mapar M <i>et al</i> , 2016	17	IV-VI	N/I	2 Mensais	Contagem de fios terminal e <i>velus</i> com lupa	6 meses	1) Diminuição média de 0,24 fios terminais e 1,64 de fios <i>velus</i>
Navarro M <i>et al</i> , 2015	100 (50 homens e 50 mulheres)	N/I	PRGF (sem leucócitos)	N/I	Fotos globais Tricograma	3 meses	1) PRGF aumentou significativamente e número de fios anagênicos e diminuiu fios telogênicos 2) Mínima melhora em mulheres comparada aos homens 3) Relato subjetivo de melhora da densidade capilar

Tabela 1: Lista de artigos sobre o uso do PRP na AAG. Legendas: * Grau de AAG de acordo com a escala Norwood-Hamilton; D/P MP = micropartículas de deltaparina e protamina; N/I = não informado; L-PRP = PRP com leucócitos; AA-PRP = PRP autólogo ativado; P-PRP = PRP puro (sem leucócitos); PRGF = Plasma rico em fatores de crescimento.

2. JUSTIFICATIVAS

A AAG tem elevada prevalência na população. Apesar de não apresentar nenhum dano à saúde física, a AAG pode ter consequências emocionais importantes, com impacto na autoestima, podendo levar a um sério problema social e de interação pessoal.

O tratamento com finasterida é atualmente o mais eficaz, mas não é isento de risco de eventos adversos, que podem ser duradouros, mesmo após sua suspensão. Além disso, mulheres não podem fazer o uso dessa medicação.

Todos os tratamentos disponíveis no momento não levam a um aumento do número de folículos capilares.

O transplante capilar é um procedimento cirúrgico de alto custo, e que muitas vezes não propicia uma aparência natural.

Até o momento, nenhum estudo correlacionou os componentes do PRP e a resposta ao tratamento na AAG, e sua análise pode contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação dessa terapêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Correlacionar o número de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento do PRP fresco e liofilizado com os parâmetros de crescimento capilar analisados pelo *TrichoScan* e o efeito do PRP liofilizado no tratamento da AAG

3.2 Específicos

- Avaliar o número de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento presentes no PRP fresco e liofilizado
- Avaliar a correlação entre o número de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento no PRP fresco e liofilizado e parâmetros do *TrichoScan* em um grupo de pacientes com AAG
- Avaliar o efeito do PRP liofilizado em comparação a placebo em um estudo piloto de pacientes com AAG

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os pacientes recrutados foram oriundos da região metropolitana de Campinas, e convidados a participar da pesquisa através de divulgação em rádio local. Após o recrutamento, os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Após a realização de algumas avaliações laboratoriais, foram incluídos nos estudos.

4.1 Seleção Dos Pacientes

A seleção foi baseada de acordo com os seguintes critérios:

- **De inclusão:** indivíduos do sexo masculino, com idade entre 18 e 50 anos, com diagnóstico de AAG grau III vértice, de acordo com a escala Norwood-Hamilton. Relatar no mínimo 6 meses de queda cabelo, e estar sem fazer o uso de qualquer medicamento para queda de cabelo, ou qualquer outro tipo de tratamento, há no mínimo 6 meses. O antecedente de tratamento medicamentoso antes dos 6 meses não foi um critério de exclusão.

- **De exclusão:** indivíduos do sexo feminino, pacientes que foram submetidos a implantes capilares; que apresentavam alguma alteração associada à queda de cabelo, como doenças da tireoide, deficiência de ferro; presença ou antecedente de neoplasia, doença hepática ou renal, doença infecto-contagiosa, doença reumatológica, doença hematológica. Não puderam participar os pacientes que estavam fazendo uso de antiagregantes plaquetário ou anti-inflamatórios.

4.2 Inclusão Dos Pacientes

Após pesquisa da história clínica, foram realizados exames laboratoriais para inclusão ou exclusão dos pacientes, tais como hemograma, glicemia, ferritina,

saturação de transferrina, TSH, T4L, PSA livre, e dosagem de testosterona e dihidrotestosterona.

Após avaliação dos resultados, os pacientes incluídos foram submetidos a uma avaliação mais detalhada da região a ser tratada.

4.3 *TrichoScan*

A técnica de *TrichoScan* foi aplicada na área de transição entre a região calva e a não calva. A área foi demarcada com tinta vermelha para referência visual, e limpa com solução à base de álcool (Kodan® Spray, Schülke & Mayr, Vienna, Austria). Com esta técnica, foi possível obter fotos digitais através de um dermatoscópio com zoom de 40 vezes (área analisada de 1,010cm²). O *TrichoScan* fornece parâmetros como: densidade capilar (em n/cm²), diâmetro capilar (em µm), taxa de crescimento capilar (em mm/dia), e taxa de relação entre cabelos *velus* / terminal.

No primeiro estudo (com PRP fresco), a avaliação com o *TrichoScan* foi feita em 3 tempos: início do tratamento, 3 meses após o início (antes da sexta aplicação), e 6 meses após o início do tratamento. No segundo estudo (com PRP liofilizado), a avaliação foi feita antes e ao término do tratamento.

4.4 Desenhos dos estudos

No primeiro estudo, todos os pacientes receberam aplicações quinzenais de PRP fresco, e não houve grupo controle. Ambos paciente e avaliador tinham conhecimento da aplicação do PRP fresco.

O segundo estudo foi prospectivo, randomizado, paciente-avaliador cego. Os pacientes selecionados para esse estudo foram subdivididos em 2 grupos:

tratamento (aplicações de PRP liofilizado) e controle (aplicações de soro fisiológico). Todos os indivíduos incluídos foram identificados por um número. A correspondência entre o número dos pacientes e seu tratamento foi realizada utilizando-se um *software* para randomização específica, mantendo essa relação em envelope lacrado. Este envelope não foi aberto até o momento da aplicação. As aplicações neste grupo foram mensais, e tanto o paciente quanto o avaliador não tinham conhecimento do tipo de tratamento efetuado.

Todas as aplicações consistiam de 20 injeções subcutâneas de 100 µL de produto (PRP ou soro fisiológico), com distância de 1 cm entre cada ponto de aplicação.

4.5 Preparo do PRP

4.5.1 PRP Fresco

Para o preparo de cada *kit* de PRP fresco, foram coletados 60 mL de sangue e divididos em 6 tubos de 8 mL com citrato ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose), um tubo seco de 8 mL para soro, e um tubo de 4 mL com EDTA para o hemograma.

Primeiramente, o tubo com EDTA foi enviado ao setor de análises clínicas do Hemocentro para realização do hemograma completo. Nos casos em que o exame apresentou qualquer tipo de alteração, a aplicação de PRP foi suspensa, para elucidação do motivo da anormalidade. Um novo PRP foi preparado apenas quando da normalização dos parâmetros alterados.

Os seis tubos de citrato ACD foram centrifugados a 300 g por 5 minutos, a 20 °C. Após esta centrifugação, com auxílio de uma seringa conectada a um *abocath* estéril, o sobrenadante (plasma) com o *buffy coat* (porção leucocitária) foram

transferidos, em um fluxo laminar, para um tubo plástico estéril tipo *Falcon* de 15 mL, e desprezada a porção eritrocitária. Portanto, o PRP produzido foi o PRP com leucócitos.

Esse tubo foi então centrifugado a 700 g, por 17 minutos, também a 20 °C. Após esta centrifugação, foram recolhidos, também em fluxo laminar, 80% do volume total de plasma, que 80% representam o plasma pobre em plaquetas (PPP). Retirou-se deste volume do PPP, 5 mL em uma seringa estéril. O uso do PPP foi feito caso houvesse a necessidade de diluição do PRP.

Os 20% do plasma restantes no tubo representam o PRP, que, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, foi homogeneizado até a diluição total dos fragmentos do *pellet*. O PRP foi então aspirado com seringa estéril para a aplicação no paciente. Cerca de 500 µL da amostra de PRP foi alíquotada em tubos plásticos de 1,5 mL para contagem de plaquetas e dosagem dos fatores de crescimento.

O tubo seco foi utilizado para a obtenção do soro autólogo. O processamento consiste em uma centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos, a 20 °C. Após a centrifugação, retirou-se, em um fluxo laminar, 1 mL do soro, com o auxílio de seringa e agulha estéreis. Este 1 mL do foi adicionado à seringa que continha o PRP, para auxiliar a ativação das plaquetas. Também foram feitas alíquotas de 500 µL deste soro em tubos plásticos estéreis de 1,5 mL para armazenamento a - 80 °C.

4.5.2 PRP Liofilizado

O PRP liofilizado foi produzido a partir de aproximadamente 450 mL de sangue total coletado em bolsa tripla por procedimento de autotransusão. A bolsa foi então centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos e 30 segundos na centrífuga Sorval RC3BP+ (rotor de bolsas), climatizada a 22 °C, com *slow stop* nível 5. Com o auxílio

de um fracionador semiautomático (Giotto®), o sobrenadante (PRP) foi transferido para uma bolsa satélite, restando na bolsa original apenas o concentrado de hemácias. A bolsa satélite foi então centrifugada a 3500 rpm por 12 minutos, climatizada a 22 °C, com *slow stop* nível 5. Em um fracionador semiautomático, foi retirado o sobrenadante, que representa o PPP, restando apenas o concentrado de plaquetas. As bolsas foram mantidas em temperatura ambiente por pelo menos uma hora para favorecer a solubilização de possíveis agregados de plaquetas que tenham se formado, que prejudicariam a quantificação e homogeneidade da amostra.

Em um fluxo laminar, foram retirados 3500 µL do PRP e colocados em um frasco estéril próprio para liofilização. Neste frasco foi adicionado um tampão de função estabilizante, composto por Tris (1,25 M, pH 7.2), glicina (1,5 M) e sacarose (1,5 M). A amostra já homogeneizada com o tampão foi congelada a – 80 °C por 1 hora antes de ser levada ao liofilizador (Christ Alpha 2-4 LO Plus 121550 PMMA, UNICAMP).

O processo de liofilização foi baseado em duas etapas: secagem principal e secagem final. Na secagem principal, a pressão foi de 0,021 atm e a temperatura foi mantida a – 55 °C. Nesta etapa, a energia em forma de calor foi extraída do material, e, posteriormente, o aumento gradual da temperatura do equipamento forneceu a energia necessária para a sublimação direta, ou seja, sem formação de uma fase intermediária líquida. Na segunda fase, a pressão foi de 0,002 atm. e a temperatura foi de – 65 °C. O objetivo desta etapa foi deixar o mínimo de umidade residual e remover o solvente em estado sólido através da menor pressão do equipamento, porém elevando sua temperatura. Após 24 horas de liofilização, o

vácuo foi retirado, e as amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes da aplicação, a amostra foi reconstituída com 4 mL de água para injeção.

Todo o procedimento foi feito em ambiente estéril, bem como todos os materiais utilizados.

4.6 Quantificação Dos Fatores De Crescimento

Os fatores de crescimento presentes no PRP foram quantificados nas alíquotas separadas durante o preparo do PRP. A determinação foi realizada pelo método do *Bio-Plex® Suspension Array System* (Bio-Rad). Foram dosadas as concentrações do PDGF-AA, VEGF e EGF.

5. ASPECTOS ÉTICOS

Os pacientes tiveram conhecimento da pesquisa através de anúncio em rádio local. Após o recrutamento e a seleção dos pacientes, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aceito pelo Comitê de Ética da UNICAMP, em que foi elucidado detalhadamente para o paciente toda a pesquisa. Os desconfortos pelos quais o paciente passou durante todo o tratamento foram, em sua maioria, locais: possível dor à coleta de sangue para exames e obtenção do PRP, sangramento e inchaço no local das aplicações. Os pacientes foram assistidos por profissionais da saúde durante todas as coletas e aplicações.

6. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em dois capítulos de acordo com os artigos preparados para submissão para publicação em revistas internacionais indexadas.

Capítulo I - *Platelet number and growth factors levels in platelet-rich plasma (PRP) and its correlation with hair growth parameters in androgenetic alopecia*

Capítulo II - *Comparison between lyophilized platelet-rich plasma (PRP) and placebo in the treatment of androgenetic alopecia and correlation with platelet number and growth factors levels. A pilot study.*

6.1 Capítulo I - Platelet number and growth factors levels in platelet-rich plasma (PRP) and its correlation with hair growth parameters in androgenetic alopecia

Autores: Bruno Lima Rodrigues, Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Rebeca Brito Bonani Cancela, Francesca Aparecida Ramos Silva, Aline Urban, Stephany Care Huber, José Luiz Rosenberis Cunha Júnior, José Fábio Santos Duarte Lana e Joyce Maria Annichinno-Bizzacchi

Local de desenvolvimento do trabalho: Laboratório de Hemostasia do Hemocentro, Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Submissão do artigo: Artigo submetido para publicação na revista *Journal of Dermatological Science*

Platelet number and growth factors levels in platelet-rich plasma (PRP) and its correlation with hair growth parameters in androgenetic alopecia

Bruno L Rodrigues¹, Silmara AL Montalvão¹, Rebeca BB Cancela¹, Francesca AR Silva¹, Aline Urban¹, Stephany C Huber¹, José Luiz RC Júnior¹, José Fábio SD Lana¹ and Joyce M Annichinno-Bizzacchi¹.

¹Hemocentro, Hemostasis Laboratory, State University of Campinas UNICAMP, Carlos Chagas Street, 480, CEP: 13083-878, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding Author:

Bruno Lima Rodrigues: brunnu.lima@gmail.com

Rua Carlos Chagas, 480, CEP: 13083-878, Campinas, SP, Brazil.

+551935218755

The authors have no conflict of interest to declare

Funding source: National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

ABSTRACT

Background: Androgenetic alopecia (AGA) is characterized by a pattern hair loss and currently, new treatments are emerging, including promising results with platelet-rich plasma (PRP). This could be related to platelet number and growth factors levels in PRP.

Objective: Analyze the platelet number and growth factors levels in the PRP and the correlation with hair growth parameters in patients diagnosed with AGA using TrichoScan as an objective method for evaluation.

Methods: Fifteen patients received four subcutaneous injections of PRP every fifteen days. The parameters evaluated were hair growth and increase of the percentage of anagen hairs at three different moments: before the treatment (t0), after the last injection (t1) and 150 days after the first injection (t2). Growth factors were measured in the PRP by Luminex method.

Results: We demonstrated a significant increase in hair count ($P = 0.0018$) and in percentage of anagen hairs ($P = 0.0070$) in 86.6% and 53.3% of the patients, respectively; but with no correlation with platelet counts or quantification of the growth factors in PRP.

Conclusion: Our data favors the use of PRP as therapeutic alternative in the treatment of AGA. The lack of association between platelet count, PDGF-AA, EGF and VEGF levels and clinical improvement pointed out other mechanisms or other growth factors that could be involved in this response.

Keywords: alopecia, hair loss, platelet rich plasma, PRP

INTRODUCTION

Androgenetic alopecia (AGA) is characterized by a pattern hair loss and is considered the most common type of alopecia in both men and women ^[1]. The prevalence of AGA is approximately 30% in men 30 years old and 50% in men over 50 years of age ^[2]. The pathophysiology is due to the hair follicle miniaturization process that occurs until follicles become ineffective in producing hair ^[3]. The development and progression of AGA result from the action of androgen hormones on the scalp: testosterone is converted into dihydrotestosterone (DHT) by the 5- α -reductase type II enzyme that is highly expressed in the AGA affected areas ^[4].

Currently, new treatments have emerged for AGA, and the use of PRP for hair loss has been studied by several authors. The platelets contain growth factors involving in many phases of the hair growth. During the embryonic phase, the platelet-derived growth factor (PDGF), the transforming growth factor- β (TGF- β) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) bind epithelial cells to the mesenchymal cells. The dermal papilla formation is influenced by the presence of TGF- β and VEGF as well ^[5]. During the adult phase, these same growth factors still act upon the follicle growth and maintenance: PDGF stimulates stem cells mitosis, VEGF helps promoting microcirculation, and TGF- β activates the dermal papilla and inhibits apoptosis during the cell cycle ^[6,7].

The majority of studies found beneficial effects of PRP on AGA ^[8-14]. However, there are some controversies between results, mainly due to different endpoints selected to evaluate the benefits of treatment. In general, more rigorous study designs, including larger samples, quantitative measurements of effect, and longer periods of follow-up are needed to solidify the utility of PRP for treating patients with AGA. In this context, an example of this heterogeneous scenario can be

expressed by recent publications. In oneway a recent study showed significant differences in mean anagen, telogen, terminal hairs and hair density, when comparing 3 PRP applications and placebo in twenty-two AGA patients, assessed by TrichoScan, while another one did not show PRP as an effective product in increasing the number of terminal hair, but the evaluation method was not TrichoScan [15,16].

By the described in the pathophysiology of AGA, the aim of our study was to investigate platelet number and PDGF, VEGF, and epidermal growth factor (EGF) levels in PRP and its correlation with growth hair parameters determined by the objective TrichoScan method.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The diagnosis of AGA was based on the personal history of progressive hair loss for more than two years and on trichoscopyc findings, such as the inversion of anagen and telogen hairs and the decrease of hair density. As a pilot study a minimum of 15 patients were included.

Inclusion criteria comprised diagnosis of AGA, age between 18 and 50 years, and presentation of an AGA-III-vertex profile according to the Norwood-Hamilton scale [17]. Exclusion criteria comprised female gender, previous hair transplantation, any disease related to hair loss such as thyroid disease and/or iron deficiency, present or past neoplasia, kidney, liver, infectious, hematologic or rheumatoid diseases. Patients who were using antiplatelet and/or anti-inflammatory drugs were also excluded.

All patients provided written informed consent approved by the ethic committee from the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas (UNICAMP).

Treatment Protocol

The protocol comprised 20 subcutaneous injections of 100 μ L in the scalp totaling 2 mL of PRP. In total, four applications were carried out every fifteen days. For the injections, the treated area was anesthetized with a 10% lidocaine ointment 15 minutes before PRP application.

Obtaining PRP

For each patient, peripheral blood were collected in six 8.5 mL ACD tubes, one 4 mL EDTA tube and one tube without anticoagulant (BD Vacutaner). L-PRP (PRP with leukocytes) preparation was performed according to the Amable methodology ^[18]: all ACD tubes were double centrifuged: the first spin at 300 g for 5 minutes, and the second spin at 700 g for 17 minutes, both at 4 °C. The buffy-coat rich with leukocytes were collected from all the ACD tubes. At the end of the second spin, the top layer plasma (80% of the total volume) was characterized as platelet poor plasma (PPP) and the lower layer (20% of the total volume) as PRP. The platelets were counted in the baseline and in the PRP samples by the Siemens Advia120 and Advia2120i hematology analyzers. Autologous serum was prepared from the tube without anticoagulant: after centrifugation at 1258 g for 15 minutes, 1 mL was separated and then added to the PRP syringe right before the application. The entire procedure was carried out in a laminar flow cabinet and all materials were

sterile. PRP samples were normalized for a concentration of 1.200×10^6 platelets/ μ l, and activated with autologous serum.

Growth Factor Concentration

The growth factors PDGF-AA, EGF and VEGF were determined by the Luminex technique (Millipore, USA), a multiplex methodology capable of detecting these growth factors simultaneously, thus providing better technical reproducibility and more accurate results. The method consists of magnetic beads coated with monoclonal antibodies specific to the human protein to be determined. The Luminex technique has a higher evaluation spectrum than the ELISA method, and is more sensitive to lower limits of protein detection even in plasma samples. Activated samples were incubated in a water bath at 37 °C for one hour. The samples were then treated with 3 cycles of nitrogen to dissolve the clot and the protocol for Luminex was initiated.

In order to evaluate the intra-individual pattern of variability, the growth factor levels of the first and the second PRP preparations were analyzed.

TrichoScan

The analysis of the effects of PRP on hair growth parameters was carried out by the TrichoScan method ^[19], which is an objective method to diagnose AGA and conduct the follow-up of the treatment. TrichoScan is a non-invasive method, which consists of standard epiluminescence microscopy, enabling an efficient evaluation of hair density, hair diameter, hair growth, and velus and terminal hair. After shaving 1.5 cm² of diameter in the hair loss area, a 1.016 cm² area was magnified 40 times using dermatoscopy. The parameters were analyzed using a

specific software (TrichoScanHD 2.0.4.204). This method was executed 3 times: t0 (before the injections), t1 (right after the last injection: 45 days), and t2 (150 days after the beginning of the treatment to evaluate the maintenance of response). The parameters analyzed were hair growth and the increase of the percentage of anagen hairs in the determined times.

STATISTICS

The statistical analyses were done by the Wilcoxon and Spearman tests. To assess the statistic normality, the Shapiro test was conducted and, once this normality was established, the t-test between the times t0 x t1, t1 x t2 e t0 x t2 were performed, and a significative P was considered if inferior to 0.0083.

RESULTS

During the period of August to December of 2014, 20 male patients were selected for this study. Only 15 patients were included according to exclusion criteria: one of them presented liver disease, three were under another treatment for hair loss, and one did not present AGA-III-vertex profile.

PRP Characterization

PRP was characterized according to platelet counts and growth factor concentrations. The median of platelets number was increased 4 folds in each of the four PRP preparations with a minimum of 728.9 and a maximum of 1.901,90 (figure 1).The median values of platelet was 1.082×10^6 cell/uL (range 608 – 2.023). The platelet count in peripheral blood sample and in PRP preparation showed a significant correlation ($r = 0.839$, $p < 0.0001$). The variability in platelet count for each

individual during the four applications was 19.7% with a minimum of 0.50% and a maximum of 56.3% (range 0.50% - 56.3%). Table 1 presents the platelet counts during the four applications.

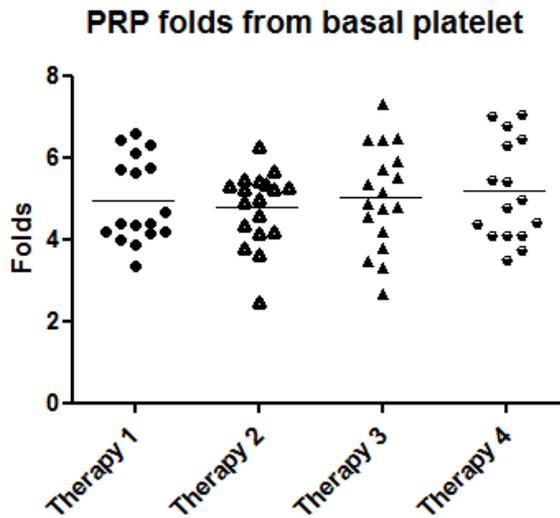


Figure 1: Platelet number folds obtained in PRP from basal platelet number in the four preparations for clinical use

The growth factor concentrations of two different PRP preparations are shown in Table 1. There was a similar intra-individual variation between these two samples in all growth factor levels, with a mean coefficient of variability of 18.4% for VEGF, 20.9% for PDGF, and 21.6% for EGF.

Table 1: Platelet counts in the four applications of PRP and quantifications of growth factor in two samples of PRP.

	PRP Platelets/mm ³			GROWTH FACTORS (mean)		
	From 4 applications			From first and second applications		
	MEAN	SD	VC (%)	EGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	PDGF (pg/mL)
Patient 1	1.145,3	122.3	10.7	877.4	466.0	96.525,9

Patient 2	886.3	25.5	2.9	325.2	209.2	64.473,3
Patient 3	1.901,9	41.7	2.2	1.088,6	396.2	181.080,4
Patient 4	873.8	140	16.0	733.6	382.2	129.616,1
Patient 5	1.313,4	291.3	22.2	1.111,8	1.671,5	181.746,8
Patient 6	1.189,3	487.2	41.0	880.3	797.6	157.660,9
Patient 7	958.5	26.2	2.7	666.9	2.527,3	132.646,9
Patient 8	1.168,9	655.5	56.1	760.6	546.7	188.957,6
Patient 9	739.6	67.2	9.1	614.1	1.370,3	87.453,0
Patient 10	1.170,1	427.8	36.6	1.029,2	913.7	172.355,6
Patient 11	1.004,0	31.8	3.2	905.9	153.2	220.079,9
Patient 12	728.9	166.2	22.8	554.4	947.4	116.363,9
Patient 13	1.205,0	639.2	53.0	1.119,1	1.925,9	199.389,1
Patient 14	1.553,0	7.1	0.5	1.436,3	612.8	167.881,3
Patient 15	1.499,5	260.9	17.4	1.301,2	513.5	203.851,2
MEAN	1.115,8	226.0	19.7	893.6	895.6	153.338,8
SD	319.7	226.2	18.7	203.8	113.6	46.588,9
VC (%)	27.7	100.1	-	21.6	18.4	20.9

EGF and PDGF concentrations showed a significant correlation with platelet number in PRP ($r = 0.8287$ and $P < 0.0001$, and $r = 0.6925$ and $P=0.0014$, respectively) (Figure 2).

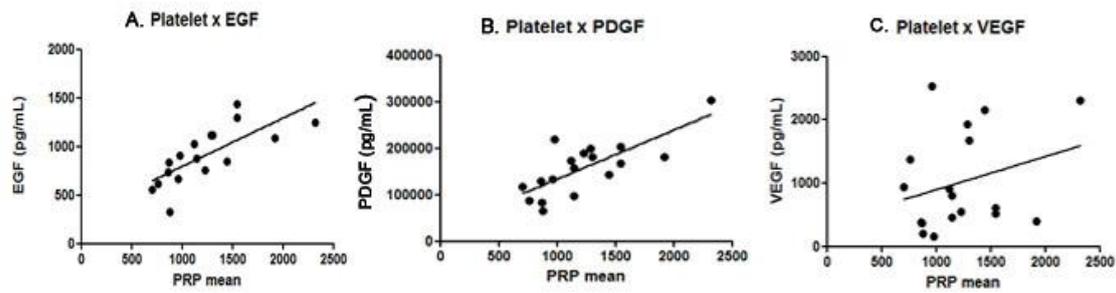


Figure 2: Graphs of correlation between the PRP mean and the mean of the growth factor concentrations

Clinical Evaluation with PRP use

The parameters carried out by the TrichoScan method showed a significant increase in hair count in 86.6% of the patients (13 patients) when comparing times t0 and t2, with a mean increase of 51.8 ± 29.3 ($P = 0.0018$).

The anagen hair percentage was significantly increased ($P = 0.0070$) between t0 and t1 in eight patients (53.3%), with 8.7% of increase (Figure 3).

There was no correlation between platelet counts or growth factor levels in PRP and the parameters evaluated by TrichoScan.

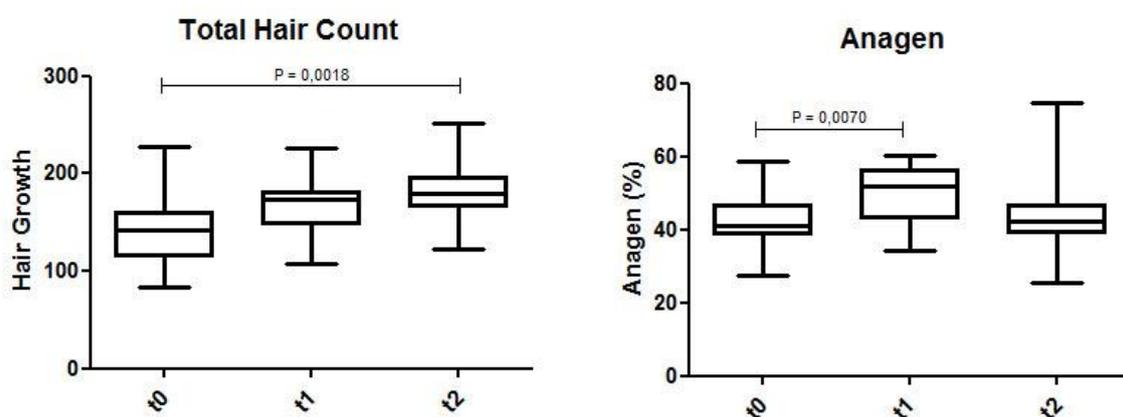


Figure 3: Graphs of the clinical evaluation in three times evaluated: increase of the hair number and the percentage of anagen hairs.

DISCUSSION

Our results objectively showed that PRP promoted increase of hair count and the percentage of anagen hairs in patients with AGA. Determination of platelet number and growth factor levels in PRP samples and the use of TrichoScan for outcomes were strength points of our study. TrichoScan is an objective non-invasive method that enables trustworthy results. The studies that analyzed PRP effect based only on before-after global photographs present some limitations, mostly regarding the overvaluation of results [20-22].

Our results are quite promising, as up to 3 months after PRP injections the increase of hair count was maintained, with no other treatment along for hair loss. Another interesting point is that PRP did not require daily medication, which is a common cause of no adherence to treatment.

In the literature, a minimum number of platelets is described to be necessary for a good therapeutic response to PRP [23-25]. In this setting, we elected a minimum number of 1 million platelets in PRP, and as observed in Table 1, we were not able to reach this objective in some patients (2, 9 and 12). However, it is important to point out that in every preparation there was an increase of 5 folds the baseline platelet counts.

Although the relationship of hair growth with growth factors are suggesting therapeutic response to PRP, no previous study correlated growth factor concentrations with the response obtained [8-16]. We evaluated PDGF-AA, EGF and VEGF levels in PRP, but we could not demonstrate any correlation with hair parameters. We observed an intra- and inter-individual variation in platelet number and growth factor levels in PRP but with no association to clinical outcome.

One possibility is that, since PRP effects depend on an orchestration between many mechanisms involved in the increase of hair count and growth, other factors, including local receptors may present a role in this response. Another hypothesis regarding the lack of correlation between PDGF-AA, EGF and VEGF levels and the clinical findings is the receptors saturation that once having exceeded the concentration threshold, leave growth factors with no additive effect.

Interestingly, cancer treatment that used tyrosine kinase inhibitors and cyclophosphamide promote the blocking of the EGF receptor function and cause premature and aberrant involution of the hair follicle, prompting an association between EGF receptor and hair growth [26]. Due to the lack of correlation of EGF concentration and clinical improvement, it corroborates the hypothesis that local receptors may have a relevant role in the response to the treatment.

New insights regarding PRP mechanism has been discussed [27]. It has been showed that, as the growth factors bind to their corresponding receptor in cell membrane, it induce a signaling cascade which activates antiapoptotic regulators, such as protein kinase B (Akt) and Bcl-2 [28-31]. Li *et al* [28], also supported that activated PRP may restore DP cells survival as they reported an *in vitro* increase of Bcl-2 and activated Akt in response to PRP.

Although our results give new understandings regarding growth factors involved in treatment of AGA with PRP, we did not measured all growth factors or signaling pathways that could contribute to this response, and this must be considered.

Regarding growth factor, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) has been considered important in several biological systems [32]. It has been suggested that IGF-1 participates in cellular migration and proliferation in hair follicles development

as the binding of IGF-1 to its receptor (IGF-1R) activates the receptor tyrosine kinase (RTK) which stimulates cell division [33-35]. Therefore, the inhibition of IGF-1 may ease the progression of hair loss and it has been suggested by an experimental model study by Zhao *et al* (2011) [36] as they showed that the decrease of IGF-1 levels by DHT action on dermal papilla promoted hair loss in mice.

In conclusion, the lack of association between platelet count, PDGF-AA, EGF and VEGF levels and clinical improvement pointed out other mechanisms or other growth factors that could be involved in this response.

One of the advantages of PRP treatment would be the lack of using continuous medication, and the applications might be annual or bi-annual. Although our data suggest a promising effect of PRP as therapeutic alternative in the treatment of AGA, only randomized placebo-controlled trial of non-inferiority compared to conventional treatments double blinded studies can established this therapeutic indication.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank CNPq for the financial support. Devanira de Souza Paixão Costa for the technical work. Alexandre Frederico, Luciana Bortolasse Ferrara and Tânia Aparecida Lopes Pinheiro for the support in this study.

References

1. Sinclair RD. Male pattern androgenetic alopecia 1998;317:865-9.
2. Thomas J. Androgenetic alopecia: status. Indian J Dermatol. 2005;50:179–90.

3. Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends in Molecular Medicine* 2001;7:293-301.
4. Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: from androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *Journal of dermatological science* 2011;61(1):1-6.
5. Kamp H, Geilen CC, Sommer C, et al. Regulation of PDGF and PDGF receptor in cultured dermal papilla cells and follicular keratinocytes of the human hair follicle. *Exp Dermatol*. 2003;12:662-72.
6. McElwee K, Hoffmann R. Growth factors in early hair follicle morphogenesis. *Eur J Dermatol* 2000;10:341-50.
7. Perez-Meza D. Wound healing and revascularization of the hair transplant graft: the role of growth factors. *Hair Transplantation* 2004;4:287-98.
8. Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Ishirara M, et al. Enhanced effect of platelet-rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatol Surg* 2011;37:1721–9.
9. Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D, Martins P. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:1458–66.
10. Cervelli V, Garcovich S, Bielli A, Cervelli G, et al. The effect of autologous activated platelet rich plasma (AA-PRP) injection on pattern hair loss: clinical and histomorphometric evaluation. *Biomed Res Int* 2014;2014:760709.
11. Lopez V, Vaya A, Bautista D, Ricart JM. Autologous platelet-rich plasma as a potential therapeutic tool in androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2013;68:SAB103.

12. Greco J, Brandt R. The effects of autologous platelet rich plasma and various growth factors on non-transplanted miniaturized hair. *Hair Transp Forum Int* 2009;19:49–50.
13. Park KY, Kim HK, Kim BJ, Kim MN. Platelet-rich plasma for treating male pattern baldness. *Dermatol Surg* 2012;38:2042–4 32.
14. Miao Y, Sun Y, Sun X, Du B, et al. Promotional effect of platelet-rich plasma on hair follicle reconstitution in vivo. *Dermatol Surg* 2013;39:1868–76.
15. Alves R and Grimalt R. Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind, Half-Head Study to Assess the Efficacy of Platelet-Rich Plasma on the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Dermatologic Surgery*. 2016;42(4):491-497.
16. Mapar MA, Shahriari S, Haghighizadeh MH. Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of androgenetic (male-patterned) alopecia: A pilot randomized controlled trial. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;1-4.
17. Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J* 1975;68:1359-1365.
18. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem cell research & therapy* 2013;4(3):67.
19. Hoffmann R. TrichoScan: a novel tool for the analysis of hair growth in vivo. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2003;8(1):109-115.
20. Navarro MR, Asín M, Martínez AM, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) for the treatment of androgenetic alopecia. *Eur J Plast Surg* 2015;1-6.
21. Schiavone G, Raskovic D, Greco J, et al. Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: a pilot study. *Dermatologic Surgery* 2014;40(9):1010-1019.

22. Singhal P, Agarwal S, Dhot PS, et al. Efficacy of platelet-rich plasma in treatment of androgenic alopecia. *Asian Journal of Transfusion Science* 2015;9(2):159.
23. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10:225–8
24. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297–300
25. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:184–90.
26. Bichsel KJ, Gogia N, Malouff T, et al. Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia. *PloS one* 2013;8(7):e69368.
27. Gupta AK, Carviel J. A Mechanistic Model of Platelet-Rich Plasma Treatment for Androgenetic Alopecia. *Dermatologic Surgery.* 2016;42(12):1335-1339.
28. Li ZJ, Choi HI, Choi DK, Sohn KC, et al. Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth. *Dermatol Surg* 2012;38:1040–6.
29. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989;109:429–40.
30. Ferraris C, Cooklis M, Polakowska RR, Haake AR. Induction of apoptosis through the PKC pathway in cultured dermal papilla fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997;234:37–46.

31. Kwon OS, Pyo HK, Oh YJ, Han JH, et al. Promotive effect of minoxidil combined with all-trans retinoic acid (tretinoin) on human hair growth in vitro. *J Korean Med Sci* 2007;22:283–9.
32. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Rev* 1995;16:3-34.
33. Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clinics* 1996;14:559-72.
34. Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinias JR, Parimoo S, Prouty SM. Hair follicle growth controls. *Dermatol Clinics* 1996;14:543-58.
35. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:21-30.
36. Zhao J, Harada N, Okajima K. Dihydrotestosterone inhibits hair growth in mice by inhibiting insulin-like growth factor-I production in dermal papillae. *Growth Hormone & IGF Research*. 2011;21(5):260-267.

6.2 Capítulo II - Comparison between lyophilized platelet-rich plasma (PRP) and placebo in the treatment of androgenetic alopecia and correlation with platelet number and growth factors levels. A pilot study.

Autores: Bruno L Rodrigues¹, Silmara AL Montalvão¹, Stephany C Huber¹, José Luiz RC Júnior¹, Beatriz M Martinelli and Joyce M Annichinno-Bizzacchi¹

Local de desenvolvimento do trabalho: Laboratório de Hemostasia do Hemocentro, Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Submissão do artigo: Artigo submetido para publicação na revista *Journal of American Academy of Dermatology*

Comparison between lyophilized platelet-rich plasma (PRP) and placebo in the treatment of androgenetic alopecia and correlation with platelet number and growth factors levels. A pilot study.

Bruno L Rodrigues¹, Silmara AL Montalvão¹, Stephany C Huber¹, José Luiz RC Júnior¹, Beatriz M Martinelli and Joyce M Annichinno-Bizzacchi¹.

¹Hemocentro, Hemostasis Laboratory, State University of Campinas UNICAMP, Carlos Chagas Street, 480, CEP: 13083-878, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding Author:

Bruno Lima Rodrigues: brunnu.lima@gmail.com

Rua Carlos Chagas, 480, CEP: 13083-878, Campinas, SP, Brazil.
+551935218755

The authors have no conflict of interest to declare

Funding source: National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

Introduction

Androgenetic alopecia (AGA) is the most common type of alopecia in both men and women. It is characterized by pattern hair loss, and it occurs due to a progressive miniaturization of the hair follicle in genetically predisposed areas in scalp (Kaliyadan *et al*, 2013, De Riveiro *et al*, 2012). The prevalence of AGA in men is approximately 50% in those above 20 years old (Sinclair *et al*, 2010). Since the goal of the currently available treatments aims only to prevent the worsening of hair thinning by reversing the process of miniaturization, they present limited effectiveness in hair growth and restoration (Varma *et al*, 2016). Therefore, the search of a new therapy is of utmost relevance.

Platelet rich plasma (PRP) is an autologous product resulting in a concentrate of platelet in a small portion of plasma (Li *et al*, 2012). Through the degranulation of α -granules, the platelets secrete growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- (TGF- β), and epidermal growth factor (EGF), among others (Miao *et al*, 2013). Given its property, PRP has been investigated in several medicine fields, and it gained attention in dermatology due to its beneficial action on promoting hair regrowth in patients who present AGA (Greco *et al*, 2009, Takikawa *et al*, 2011, Park *et al*, 2012, Miao *et al*, 2013, Cervelli *et al*, 2013). Although a minimum number of platelets and growth factor concentration is described to be necessary for response to PRP (Landesberg *et al*, 2000, Marx, 2001, Weibrich *et al*, 2002), no previous study correlated these parameters with the response obtained.

The use of autologous PRP eliminates the potential for transmission and immunogenicity of disease. However, the preparation requires time to process the blood, and its cells have a short half-life and should be applied a few hours after the

end of the process (McCarrel et al, 2009). Given this, the process of lyophilization of PRP seems to be a very interesting possibility in clinical practice. Studies with its use in bone grafts have shown promising results (Pietramaggiori et al, 2006, Markou et al, 2009), due to the potential to concentrate platelets and growth factors, even when stored for several weeks after preparation (Pan, 2016).

Materials and Methods

Patients

To diagnose AGA, the patients recruited performed trichoscopic exam in order to evaluate hair count, hair density and the percentage of anagen and telogen hairs. They also reported personal history of progressive hair loss for more than two years. All patients provided written informed consent approved by the ethic committee from the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas (UNICAMP).

The inclusion criteria included the age between 18 and 50 years and the presentation of an AGA-III-vertex profile according to the Norwood-Hamilton scale (Norwood, 1975). Exclusion criteria comprised female gender, previous hair transplantation, present kidney, liver, infectious, hematologic or rheumatologic diseases, and present or past neoplasia. Patients who were using antiplatelet and/or anti-inflammatory drugs were also excluded.

The patients were randomized in two different groups: treatment group (PRP injections) and control group (saline injections). Neither the patients nor the evaluator were aware of what was injected.

TrichoScan

TrichoScan is an objective method to diagnose AGA and conduct the follow-up of the treatment (Hoffmann, 2003). It consists on a non-invasive method of standard epiluminescence microscopy, enabling an efficient evaluation of hair density, hair diameter, hair growth, and velus and terminal hair. After shaving 1.5 cm² of diameter in the hair loss area, and a 1.016 cm² area was magnified 40 times using dermatoscopy. The parameters were analyzed using a specific software (TrichoScanHD 2.0.4.204). This method was executed 2 times: t0 (before the injections) and t1 (right after the last injection: 45 days). The parameters analyzed were hair growth and the increase of the percentage of anagen hairs. In order to make sure that the very same area were evaluated in these two times, a small black dot was painted in the middle of the shaved area, and the patients were asked to redo the painting every two days.

Treatment Protocol

The treated area was anesthetized with a 10% lidocaine ointment 15 minutes before application. Then, 2 mL of PRP or saline were applied in the scalp through 20 subcutaneous injections of 100 µL. In total, three applications were carried out monthly.

Obtaining Lyophilized PRP

The lyophilized PRP was obtained through a self-transfusion procedure of the whole blood collected in a triple bag of each patient (approximately 450 mL). The bag was centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes and 30 seconds in the Sorval RC3BP + centrifuge, heated to 22 °C. Using a semi-automatic fractionator (Giotto ®), the supernatant (PRP) was transferred to a satellite bag, leaving the red cell concentrate

in the original bag. The satellite bag was then centrifuged at 3500 rpm for 12 minutes, heated to 22 °C and configured with a slow stop level 5. In the semiautomatic fractionator, the supernatant, representing PPP, was removed, leaving only the platelet concentrate, called PRP. The bags were maintained at room temperature for at least one hour to favor the solubilization of possible platelet aggregates that might have formed and that could impair the quantification and homogeneity of the sample.

In a laminar flow, 3500 µL of the PRP was removed and placed in a sterile vial suitable for freeze-drying. A buffer of stabilizing function, composed of Tris (1.25 M, pH 7.2), glycine (1.5 M) and sucrose (1.5 M) was added in this vial. The samples, already homogenized with the buffer, were frozen at - 80 °C for 1 hour before being transferred to the lyophilizer (Christ Alpha 2-4 LO Plus 121550 PMMA, UNICAMP).

The freeze-drying process was based on two steps: main drying and final drying. In the main drying, the pressure was 0.021 atm and the temperature was maintained at - 55°C. In this stage, energy in heat form is extracted from the material, and, subsequently, the gradual increase in temperature provides the energy required for direct sublimation, without the formation of a liquid intermediate phase. In the second stage, the pressure was 0.002 atm and the temperature was -65 °C. The objective of this step was to leave the minimum of residual moisture and to remove the solvent in solid state through the lower pressure, but raising its temperature. After 24 hours of lyophilization, the vacuum was withdrawn, and the samples were stored at -20. Prior to application, the sample was reconstituted with 4 mL of water for injection. The entire procedure and all materials used were sterile.

Although the control group did not receive this product, the patients in this group had the blood harvested and the PRP was prepared and lyophilized.

Growth Factor Concentration

The growth factors were determined by the Luminex technique (Millipore, USA). The method consists of magnetic beads coated with monoclonal antibodies specific to the human protein to be determined. The Luminex technique is a multiplex methodology capable of detecting these growth factors simultaneously, thus providing better technical reproducibility and more accurate results. In this study, the growth factors determined were PDGF-AA, EGF and VEGF.

Statistics

To assess the statistic normality, the Shapiro test was conducted and, once this normality was established, the Wilcoxon and Spearman tests between the times t0 x t1 and the groups were performed, and a significative P was considered if inferior to 0.005.

Results

Patients

This was a pilot, randomized, placebo-controlled and patient-avaluator blinded study. During the period of July to December of 2016, thirty individuals were recruited for the study. According to the inclusion and exclusion criteria, only twenty-two patients were included, as five of them did not present AGA-III-vertex profile and three were under another treatment for hair loss.

They were randomized into two groups: a) control group (11 patients), and b) treatment group (11 patients) .In both groups, all patients performed the process of blood harvesting, but only the patients in treatment group received PRP.

PRP Characterization

PRP was characterized according to platelet count and growth factor concentrations.

The median of platelet number in PRP prepared for both groups was $1.195 \times 10^3/\mu\text{L}$, with a minimum of $628 \times 10^3/\mu\text{L}$ and a maximum of $1.359 \times 10^3/\mu\text{L}$. This represents a significantly increased in 4.7 times the baseline count ($p < 0.0001$) (figure 1).

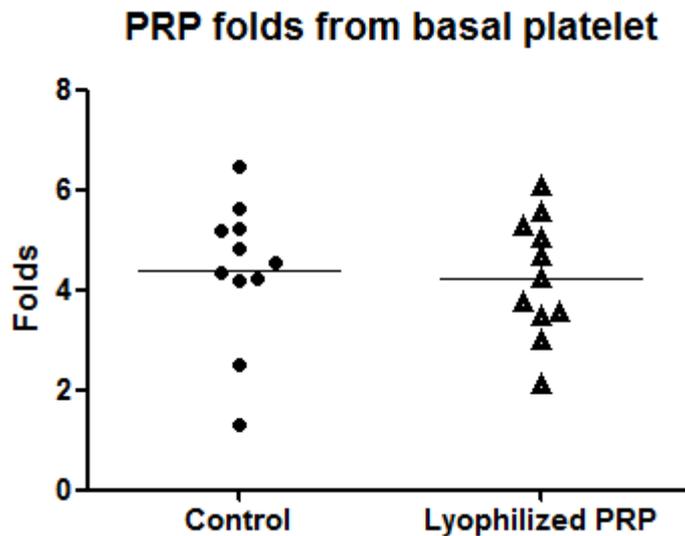


Figure 1 Platelets fold in lyophilized PRP injected or only prepared and not injected (control PRP).

As the lyophilization process allows only one blood harvest, the growth factors in PRP were determined only one time, as shown in figure 2. The median of EGF concentration was 391.23 pg/mL, with a minimum of 43.86 pg/mL and a maximum of 598.95 pg/mL. The median of VEGF concentration was 432.47 pg/mL, with a minimum of 219.54 pg/mL and a maximum of 601.02 pg/mL. The median of

PDGF concentration was 6.971,2 pg/mL, with a minimum of 4.539,55 pg/mL and a maximum of 22.317,63 pg/mL. The mean coefficient of inter-individual variability of these growth factors was 47%, 30% and 68%, respectively.

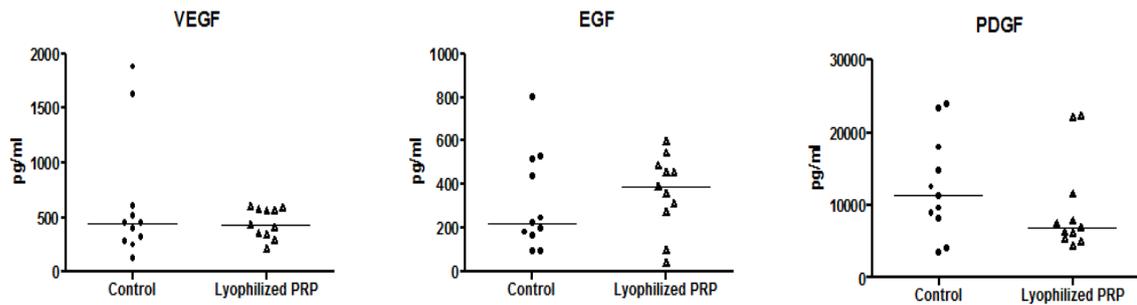


Figure 2: Growth factors concentration in lyophilized PRP injected or only prepared and not injected (control PRP).

Clinical Evaluation

The parameters of hair growth carried out by TrichoScan were analyzed in both groups and then the pre- and post-treatment results were compared. All the results are shown on figure 3.

Regarding hair count, the control group showed a median of 211.5 hairs (minimum of 78 hairs and maximum of 334 hairs) before saline injection, and 219 hairs (minimum of 125 hairs and maximum of 285 hairs) after saline injection, whereas the PRP group showed a median of 166 hairs (minimum of 72.5 hairs and maximum of 263 hairs) before the PRP treatment, and 175 hairs (minimum of 93 hairs and maximum of 253 hairs) after the treatment. Neither control nor PRP group showed significant response to treatment ($p = 0.638$ and $p = 0.206$, respectively). A similar result was seen between the groups ($p = 0.533$).

Before the saline injections, the control group showed a median of hair density of 208 hair/cm² (minimum of 76.8 hair/cm² and maximum of 328 hair/cm²), whereas the PRP group showed a median of 168 hair/cm² (minimum of 74.6 hair/cm² and maximum of 259 hair/cm²). After the saline injections, the median of hair density increased to 211 hair/cm² (minimum of 123 hair/cm² and maximum of 287 hair/cm²) in the control group, and 177 hair/cm² (minimum of 94.5 hair/cm² and maximum of 255 hair/cm²) in the PRP group. Neither control nor PRP group showed significant differences ($p = 0.765$ and $p = 0.143$, respectively). A similar result was seen between the both groups ($p = 0.478$).

Regarding anagen percentage, the control group showed a median of 43.3% (minimum of 26.8% and maximum of 56.4%) before the saline injections, and 48% (minimum of 34.5% and maximum of 57.4%) after the saline injections. The PRP group showed a median of 48.5% (minimum of 24.7% and maximum of 61.3%) before PRP treatment, and 51.4% (minimum of 26% and maximum of 69%) after the treatment. This increase seen in both group was not significant ($p = 0.147$ and $p = 0.398$, respectively). No difference was observed when comparing both groups ($p = 0.718$).

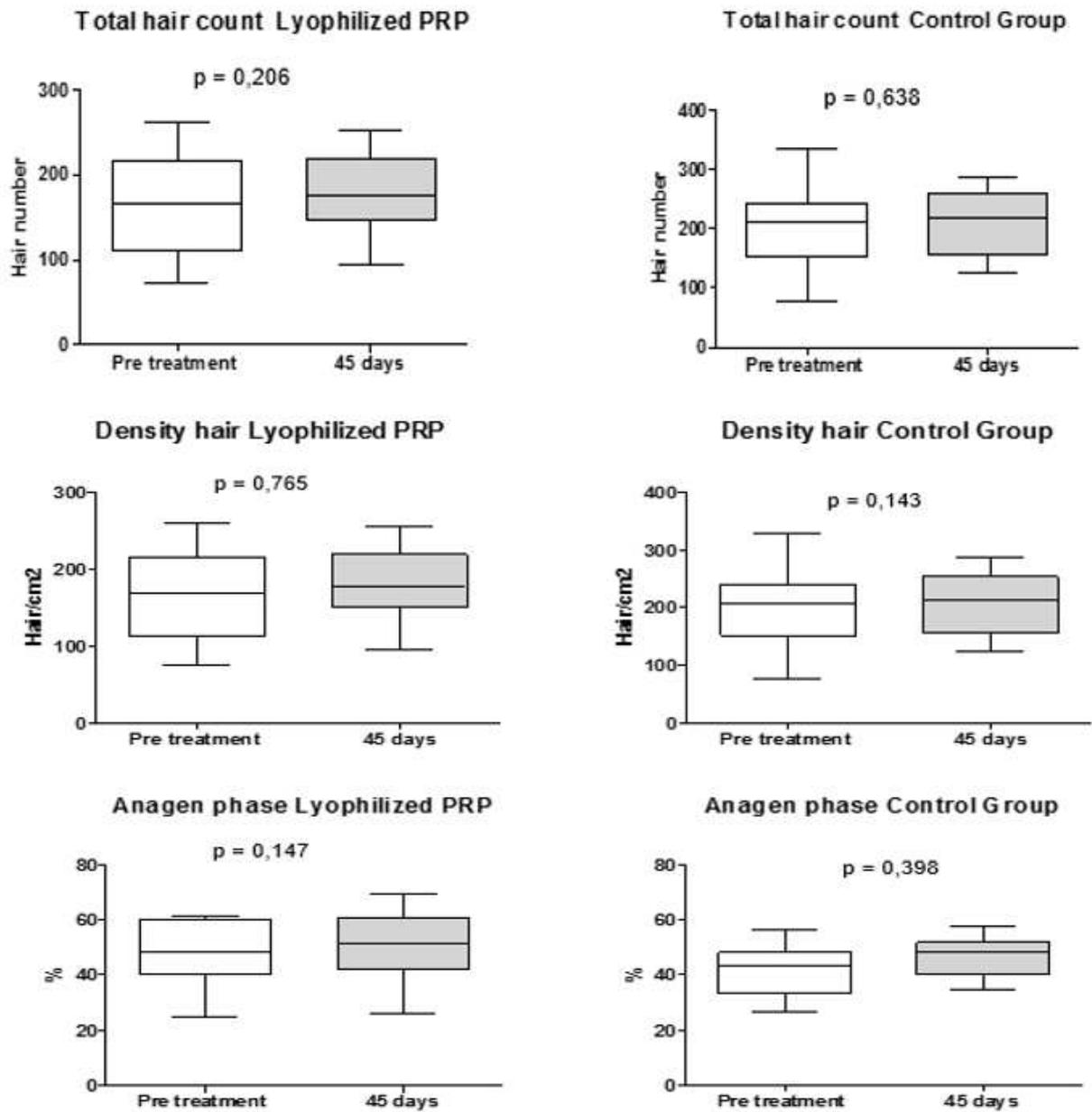


Figure 3 – Clinical evaluation 45 days after the first application of lyophilized PRP.

The parameters evaluated by TrichoScan showed no significant correlation with the platelet count and/or growth factors concentrations in PRP.

DISCUSSION

In this randomized, patient-evaluator blinded, placebo-controlled study, the results showed that although the practical advantages of lyophilized PRP, an improvement in the parameters analyzed was not observed.

The process of platelets lyophilization was described for more than 60 years (Bode *et al*, 2006), and the possibility to deliver growth factors using platelets could make this freeze-drying method a suitable and interesting approach for treatment of AGA. This was not previously described.

Recently our research group produced a lyophilized PRP with characteristics very similar to fresh PRP, and this allowed us to investigate its use in patients with AGA (Silva *et al*, 2016).

However, the analysis of platelet count and concentration of growth factors in this study revealed lower values than that obtained previously (Silva *et al*, 2016). This emphasizes that many variables may interfere with this process, which can compromise the final PRP product and consequently the clinical treatment. It also shows that the standardization of this product becomes valuable before any clinical study.

Otherwise, we previously investigated the correlation between platelet count and some growth factor concentrations in fresh PRP and TrichoScan parameters in 15 individuals with AGA. Although clinical improvement after treatment, we were not able to demonstrate any correlation. As growth factor levels in fresh PRP were much higher than in the lyophilized PRP of the present study, one hypothesis is that a minimum concentration of those factors is mandatory for therapeutic effect. In addition, the follow-up period in this study was lower than the study with fresh PRP (45 days and three months, respectively), which does not ruled out a positive result in a long time.

Giusti *et al.* (2009) suggested a platelet concentration of 1,500,000 platelets/ μ L in order to induce angiogenesis in endothelial cells. In this study we obtained a mean of 1.195×10^6 platelets/ μ L of platelet in PRP. As we did not reach for the optimal value, this preparation did not seem to be effective on stimulating follicular angiogenesis, as VEGF is one of the major needed factors in hair growth (Mecklenbur *et al.*, 2000). A biopsy of the scalp could be very interesting to confirm this hypothesis.

One of the controversies when using PRP is the effect that needling may exert, inducing release of growth factors (PDGF and EGF), and activation of stem cells in the hair bulge area under wound healing conditions (Jeon *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2012). Dhurat *et al.* (2013) reported microneedling technique as a promising tool for the treatment of AGA in both men and women. Since PRP is applied through injections, it was important to demonstrate that there was no difference in the evolution of alopecia in a group treated only with saline injection on scalp by needling. Given this, our results suggested that the needling does not have an effect on hair parameters in patients with AGA.

Even though the patients in this study were clinically classified as AAG-III vertex, according to the Norwood-Hamilton scale, TrichoScan data showed that the control group had a milder profile of the disease. Even so, there was no clinically significant improvement with needling.

As the follicle miniaturization is a slow process, AGA presents a variety of phenotypes (Norwood, 1975). Indeed, the response to treatment could be absent in those presenting a more advanced stage of AGA. Mapar *et al.* (2016) emphasizes this suggestion as they reported as a limitation in their study the selection of patients who presented an advanced stage of AGA. So, this is a strength point of our study, as this is a homogeneous population, as we only included patients with AGA-III vertex

classification. However, we could not demonstrate a response to lyophilized PRP treatment.

Although the lyophilization process may compromise the cells present in the PRP, in this case the platelets, the therapeutic effect is related to the growth factors. It is well established that lyophilization does not compromise protein function, and even in previous studies performed in our laboratory, we demonstrated a normal function of lyophilized growth factors in cellular experiments using endothelial cells (Silva *et al*, 2016).

Although our results do not demonstrate a favorable effect of lyophilized PRP on stage III-vertex AGA, a new study using a product with minimal concentration of growth factors would allow a more accurate definition. We also emphasize the importance in clinical studies, to analyse the products before its use, to define its real therapeutic effect.

References

Bode AP, Fischer TH. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2007;35(1):125-133.

Cervelli V, Garcovich S, Bielli A, Cervelli G, et al. The effect of autologous activated platelet rich plasma (AA-PRP) injection on pattern hair loss: clinical and histomorphometric evaluation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:760709.

De Rivero Vaccari JP, Sawaya ME, Brand F III, Nusbaum BP, et al. Caspase-1 level is higher in the scalp in androgenetic alopecia. *Dermatol Surg.* 2012;38(7-1):1033–9.

Dhurat R, Sukesh MS, Avhad G, Dandale A, Pal A, Pund P. A randomized evaluator blinded study of effect of microneedling in androgenetic alopecia: a pilot study. *International journal of trichology.* 2013;5(1);6.

Greco J, Brandt R. The effects of autologous platelet rich plasma and various growth factors on non-transplanted miniaturized hair. *Hair Transp Forum Int.* 2009;19:49–50.

Hoffmann R. TrichoScan: a novel tool for the analysis of hair growth in vivo. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 2003;8(1):109-115.

Jeong K, Lee YJ, Kim JE, Park YM, Kim BJ, Kang H. Repeated microneedle stimulation induce the enhanced expression of hair-growth-related genes. *Int J Trichology* 2012;4:117.

Kaliyadan F, Nambiar A, Vijayaraghavan S. Androgenetic alopecia: an update. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013;79:613–25.

Kim BJ, Lim YY, Kim HM, Lee YW, Won CH, Huh CH. Hair follicle regeneration in mice after wounding by microneedle roller. *Int J Trichology* 2012;4:117.

Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:297–300.

Li ZJ, Choi HI, Choi DK et al. Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth. *Dermatol Surg.* 2012; 38:1040–6.

Lopez V, Vaya A, Bautista D, Ricart JM. Autologous platelet-rich plasma as a potential therapeutic tool in androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68:SAB103.

Mapar MA, Shahriari S, Haghizadeh MH. Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of androgenetic (male-patterned) alopecia: A pilot randomized controlled trial. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy.* 2016;1-4.

Markou, N. et al. Treatment of periodontal endosseous defects with platelet-rich plasma alone or in combination with demineralized freeze-dried bone allograft: a comparative clinical trial. *J Periodontol* 80, 1911–1919, doi: 10.1902/jop.2009.090216 (2009).

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10:225–8.

McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009;27;1033–1042.

Mecklenburg L, Tobin DJ, Müller-Röver S, Handjiski B, Wendt G, Peters EM, Paus R. Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology* 2000;114-5;909–916.

Miao Y, Sun Y, Sun X, Du B, et al. Promotional effect of platelet-rich plasma on hair follicle reconstitution in vivo. *Dermatol Surg.* 2013;39:1868–76.

Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J.* 1975;68:1359-1365.

Pan L, Yong Z, Yuk KS, Hoon KY, Yuedong S, Xu J. Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. *Aesthetic Plast Surg.* 2016;40;157–163.

Park KY, Kim HK, Kim BJ, Kim MN. Platelet-rich plasma for treating male pattern baldness. *Dermatol Surg* 2012;38:2042–4 32.

Pietramaggiori G, Kaipainen A, Czezugha JM, Wagner CT, Orgill DP. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2006;14; 573–580.

Silva LQ; Montalvão SAL; Huber SC; Paula EV; Annicchino-Bizzacchi JM. Platelet activation is not crucial for Platelet-Rich Plasma (PRP), when used as autologous therapeutic product, and could be lyophilized without any growth factor loss. In: American Society of Hematology, 2016, San Diego. ASH Annual Meeting Abstracts.

Sinclair RD, Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. In Disorders of Hair. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. Rook's Textbook of Dermatology. 8th edition. UK: Blackwell Publishing Ltd. 2010;6;16-66.31.

Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Ishirara M, et al. Enhanced effect of platelet-rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatol Surg*. 2011;37:1721–9.

Varma, K., Agrawal, A., & Agrawal, M. A study of efficacy of platelet rich plasma in treatment of androgenetic alopecia in male patients. *Indian Journal of Clinical and Experimental Dermatology*. 2016;2(2):40-44.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:184–90.

7. DISCUSSÃO GERAL

A AAG é considerada uma condição com grandes complicações na autoestima dos pacientes, muitas vezes levando a altos níveis de ansiedade e depressão (Tabolli *et al*, 2013, Sampogna *et al*, 2013).

Os tratamentos atuais disponíveis incluem o uso tópico de minoxidil e a administração oral de finasterida (1 mg/dia), um inibidor da enzima tipo II da 5- α -redutase (Olsen *et al*, 2005). O minoxidil é um medicamento vasodilatador e, como um efeito colateral, retarda a perda de cabelo em um curto período de seu uso. Porém, como não inibe o processo biológico do folículo capilar, em pouco tempo o processo de perda de cabelo é reinstalado (Mulinari-Brenner *et al*, 2009, Sinclair, 1998). Como seu uso chega a duas vezes ao dia, os efeitos colaterais, que são em sua maioria locais, se tornam mais incômodos (Schiavone *et al*, 2014). A eficácia da finasterida é bastante elevada, e é normalmente observada após 4 meses de tratamento. Este medicamento não pode ser tomado por mulheres, principalmente por mulheres grávidas, devido ao risco de aborto e malformação fetal (Sinclair, 1998). Embora estes tratamentos previnam a perda de cabelo e aumentam o período da fase anagênica, não são tão eficientes na regeneração folicular em áreas já afetadas. Além disso, embora não tão frequente, os efeitos colaterais são muito desagradáveis (Sinclair, 1998, Weide, 2009). A finasterida está associada à disfunção erétil e à libido prejudicada. Como o número de usuários é grande, incluindo a população jovem, esse alerta não pode ser negligenciável (Sinclair, 1998, Miteva *et al*, 2012). Estes tratamentos mostraram resultados satisfatórios, mas limitados ao uso contínuo relacionado à possibilidade de efeitos colaterais.

O uso do PRP permitiu novas perspectivas no tratamento da AAG (Takikawa *et al*, 2011, Cervelli *et al*, 2014, Li *et al*, 2012, Alves *et al*, 2016, Schiavone *et al*, 2014). Sua eficácia pode estar relacionada à presença dos fatores de crescimento que são liberados pelas plaquetas concentradas (McElwee *et al*, 2000, Perez-Meza *et al*, 2004). A ação dos fatores de crescimento no ciclo germinativo capilar já foi bastante estudada tanto na fase embriogênica como na fase adulta (Sten *et al*, 1996, McElwee *et al*, 2000, Perez-Meza *et al*, 2004). No entanto, a correlação entre a concentração dos fatores de crescimento e a resposta ao tratamento com PRP na AAG não foi estudado até o momento.

Nossos resultados mostraram que o PRP fresco promoveu o aumento do número de fios e da porcentagem de fios anagênicos em pacientes que apresentavam perfil III-vértice de AAG. Os efeitos observados foram mantidos por até 3 meses após as injeções, sem nenhum tratamento adjuvante para a perda de cabelo. Por outro lado, o PRP liofilizado não mostrou qualquer efeito benéfico nos pacientes incluídos e classificados como III-vértice AAG.

Uma possível hipótese é que no PRP fresco, os níveis de fatores de crescimento estão mais elevados que no PRP liofilizado. Na literatura, é sugerida uma concentração mínima dos fatores para se obter um resultado favorável (Marx, 2001, Landesberg *et al*, 2000, Weibrich *et al*, 2002).

Um outro resultado intrigante foi a não correlação entre a resposta ao tratamento avaliado por parâmetros do *TrichoScan* e a concentração do PDGF-AA, EGF e VEGF, e a contagem de plaquetas. Isto sugere que outros componentes plaquetários e/ou algum estímulo endógeno possam estar envolvidos no mecanismo de crescimento capilar, uma vez que, como limitação deste estudo, não foram dosados todos os fatores de crescimento presentes no PRP. Além disso, os

receptores dos fatores de crescimento do couro cabeludo também podem ter um papel relevante nessa resposta.

Para indução de angiogênese em células endoteliais, a média de concentração plaquetária sugerida é de 1.500.000 plaquetas/ μ L (Giusti *et al*, 2009). Como não alcançamos este valor em nenhuma das preparações de PRP (1,115 x10⁶/uL no PRP fresco, e 1,195 x10⁶/uL no PRP liofilizado), o processo de angiogênese folicular pode não ter sido adequadamente induzido, evitando a obtenção de um resultado mais favorável. Porém, é necessário um estudo com biópsias do couro cabeludo para a confirmação desta hipótese.

A grande maioria dos estudos sobre PRP na AAG utilizam como método de avaliação fotos globais do couro cabeludo (Schiavone, Alves, Mapar, Navarro, Singhal). Este método pode gerar resultados controversos, uma vez que a iluminação, tipo de câmera, e posição do paciente e fotógrafo podem influenciar, gerando um resultado falso positivo. Um dos pontos fortes deste estudo foi justamente a utilização do *TrichoScan* para avaliação dos resultados, um método objetivo, não invasivo, e que permite resultados confiáveis (Hoffman, 2003).

8. CONCLUSÃO

- O PRP fresco promoveu crescimento de novos fios e aumentou a porcentagem de fios anagênicos pré e pós aplicação; enquanto o PRP liofilizado não promoveu melhora clínica da AAG
- Não se observou correlação entre o número de plaquetas e a concentração de alguns fatores de crescimento do PRP fresco com a melhora nos parâmetros do *TrichoScan*. Isto sugere que o efeito terapêutico depende da ação de outros fatores presentes no PRP, ou é mediada pela resposta dos receptores presentes no couro cabeludo
- Apesar de demonstrado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Silva *et al*, 2016), o processo de liofilização neste estudo não permitiu uma concentração de fatores de crescimento igual ou superior ao do PRP fresco, o que pode ter comprometido o resultado clínico

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves R and Grimalt R. Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind, Half-Head Study to Assess the Efficacy of Platelet-Rich Plasma on the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Dermatologic Surgery*. 2016;42(4):491-497.

Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco Í, do Amaral RJFC, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem cell research & therapy* 2013;4(3):67.

Azzena B, Mazzoleni F, Abatangelo G, Zavan B, Vindigni V. Autologous platelet-rich plasma as an adipocyte in vivo delivery system: case report. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32:155–8. Discussion 159–61.

Bichsel KJ, Bichsel KJ, Gogia N, Malouff T, Pena Z, Forney E, Hammiller B, Hansen LA. Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia. *PloS one* 2013;8(7):e69368.

Cervelli V, Garcovich S, Bielli A, Cervelli G. The effect of autologous activated platelet rich plasma (AA-PRP) injection on pattern hair loss: clinical and histomorphometric evaluation. *Biomed Res Int* 2014;2014:760709.

Cervelli V, Palla L, Pascali M, De Angelis B, Curcio BC, Gentile P. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. *Aesthetic Plast Surg* 2009;33:716–21.

Chesire DR, Isaacs WB. Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/ TCF signaling by androgen receptor. *Oncogene* 2002;21:8453–69.

Cho JM, Lee YH, Baek RM, Lee SW. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. *Plast Reconstr Surg* 2011;64:e31–9.

Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *TRENDS in Molecular Medicine* 2001;7:293-301.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1502–8.

Gupta AK, Carviel J. A Mechanistic Model of Platelet-Rich Plasma Treatment for Androgenetic Alopecia. *Dermatologic Surgery*. 2016: 42(12): 1335-1339.

Hoffmann R. TrichoScan: a novel tool for the analysis of hair growth in vivo. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2003;8(1):109-115.

Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: from androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *Journal of dermatological science* 2011;61(1):1-6.

Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Rev* 1995;16:3-34.

Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:1352–9.

Kamp H, Geilen CC, Sommer C. Regulation of PDGF and PDGF receptor in cultured dermal papilla cells and follicular keratinocytes of the human hair follicle. *Exp Dermatol*. 2003;12:662-72.

Kwack MH, Sung YK, Chung EJ, Im SU. Dihydrotestosteroneinducible dickkopf 1 from balding dermal papilla cells causes apoptosis in follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008;128:262–9.

Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297–300.

Li ZJ, Choi HI, Choi DK, Sohn KC, Im M, Seo YJ, Lee YH, Lee JH, Lee Y. Autologous platelet-rich plasma as a potential therapeutic tool in androgenetic alopecia. *Dermatologic Surgery*. 2012;38(7-1);1040-1046.

Mapar MA, Shahriari S, Haghizadeh MH. Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of androgenetic (male-patterned) alopecia: A pilot randomized controlled trial. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;1-4.

Markou N, Pepelassi E, Vavouraki H, Stamatakis HC, Nikolopoulos G, Vrotsos I, Tsiklakis K. Treatment of periodontal endosseous defects with platelet-rich plasma alone or in combination with demineralized freeze-dried bone allograft: a comparative clinical trial. *J Periodontol*. 2009;80;1911–1919.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225–8.

McCarrel, T. & Fortier, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res*. 2009;27;1033–1042.

McElwee K, Hoffmann R. Growth factors in early hair follicle morphogenesis. *Eur J Dermatol* 2000;10:341-50.

Miteva M, Tosti A. Treatment options for alopecia: an update, looking to the future. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:1271–81.

Mulinari-Brenner F, Soares IF. Male pattern baldness: an update. *Revista de Ciências Médicas* 2009;18(3):153-161.

Navarro MR, Asín M, Martínez AM. Plasma rich in growth factors (PRGF) for the treatment of androgenetic alopecia. *Eur J Plast Surg* 2015;1-6.

Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J* 1975;68:1359-1365.

Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, Bergfeld WF, Hordinsky MK, Roberts JL, Whiting DA. Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;52(2);301-311.

Pan L, Yong Z, Yuk KS, Hoon KY, Yuedong S, Xu J. Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. *Aesthetic Plast Surg*. 2016;40; 157–163.

Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M. Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* 2002;277:20702–10.

Perez-Meza D. Wound healing and revascularization of the hair transplant graft: the role of growth factors. *Hair Transplantation* 2004;4:287-98.

Peus D, Pittelkow MR. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle. *Dermatol Clinics* 1996;14:559-72.

Pietramaggiori G, Kaipainen A, Czezugha JM, Wagner CT, Orgill DP. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2006;14;573–580.

Sampogna F, Tabolli S, Abeni D. Impact of different skin conditions on quality of life. *G Ital Dermatol Venereol* 2013;148:255–61.

Schiavone G, Raskovic D, Greco J, Abeni D. Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: a pilot study. *Dermatologic Surgery.* 2014;40(9):1010-1019.

Sclafani AP. Application of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2009;25:270–6.

Sinclair RD. Male pattern androgenetic alopecia 1998;317:865-9.

Singhal P, Agarwal S, Dhot PS. Efficacy of platelet-rich plasma in treatment of androgenic alopecia. *Asian Journal of Transfusion Science* 2015;9(2):159.

Stenn KS, Combates NJ, Eilertsen KJ, Gordon JS, Pardinias JR, Parimoo S, Prouty SM. Hair follicle growth controls. *Dermatol Clinics* 1996;14:543-58.

Stenn KS, Paus R. Hair follicle growth controls. *Physiol Rev* 2001;81:449-494.

Su LH, Chen THH. Association of androgenetic alopecia with smoking and its prevalence among Asian men: a community-based survey. *Archives of dermatology*. 2007;143(11); 1401-1406.

Tabolli S, Sampogna F, di Pietro C, Mannooranparampil TJ, et al. Health status, coping strategies, and alexithymia in subjects with androgenetic alopecia: a questionnaire study. *Am J Clin Dermatol* 2013;14:139–45.

Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Ishirara M. Enhanced effect of platelet-rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatol Surg* 2011;37:1721–9.

Thomas J. Androgenetic alopecia: Current status. *Indian J Dermatol*. 2005;50:179–90.

Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D, Martins P. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:1458–66.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:21-30.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002;30:97–102.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:184–90.

Zhao J, Harada N, Okajima K. Dihydrotestosterone inhibits hair growth in mice by inhibiting insulin-like growth factor-I production in dermal papillae. *Growth Hormone & IGF Research*. 2011;21(5):260-267.