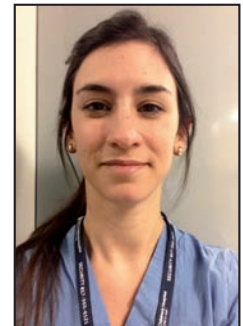


Utilización de plasma rico en plaquetas en la profilaxis del daño cutáneo inducido por radioterapia: modelo experimental

Use of platelet rich plasma as prophylactic method for skin damage after radiotherapy: experimental study

Lucía D'OLIVEIRA-PAZOS*, Juan-Manuel FOSSATI-COLA*, Daniel-Andrés WOLFF-DE-FREITAS**
Álvaro LUONGO-GARDI***, Marta OTERO****, Beatriz CARRASCO*****



d'Oliveira-Pazos, L.

Resumen

Introducción y Objetivos. La radioterapia conlleva la aparición de complicaciones cutáneas que afectan a la calidad de vida del paciente y en algunos casos condicionan la reconstrucción. El plasma rico en plaquetas (PRP) es una terapia emergente; se trata de una sustancia autóloga, biocompatible, segura y económica. Está descrito su uso en disminución de la inflamación local, de los tiempos de curación de las heridas, en el tratamiento de lesiones por radioterapia y últimamente en el campo de la Medicina Estética mejorando la calidad de la piel. Nuestro estudio analiza el uso del PRP en la profilaxis de las lesiones cutáneas inducidas por radioterapia evaluando un modelo experimental.

Material y Métodos. Realizamos un ensayo clínico controlado, doble ciego, en animales: 12 ratas Wistar, 2 para la obtención del PRP y 10 para el análisis clínico e histológico.

Resultados. Del análisis clínico destacamos que de los sectores sin PRP previo a la radioterapia: 8 ratas presentaron alopecia y 7 hipopigmentación. La alopecia fue total en un 60%, parcial en 20% y un 20% no presentó alopecia. En los sectores con PRP: 4 presentaron alopecia y 3 hipopigmentación. La alopecia fue parcial en un 40%, un 60% no presentó alopecia y no hubo casos de alopecia total. Los resultados del análisis histológico demostraron un 100% de atrofia leve-moderada para los sectores con PRP. Por contrapartida, los sectores sin PRP presentaron 80% de atrofia moderada-severa y un 20% de atrofia leve-moderada.

Conclusiones. Existe un beneficio en el uso del PRP como profilaxis de la alopecia ($p < 0.05$) e hipopigmentación ($p < 0.1$) inducido por radioterapia en un modelo experimental.

Abstract

Background and Objectives. Radiotherapy is usually associated with skin complications that affect the quality of life of patients and in some cases can also affect the timing of the reconstruction. The platelet-rich plasma (PRP) is an emerging therapy; is autologous, safe and economic. Current use of PRP includes: efficacy in decreasing local inflammation, enhance wound healing, treatment of skin ulcers caused by radiotherapy and its use extends to the field of aesthetic plastic surgery improving the quality of the skin. The authors made an experimental trial to analyze the use of PRP as a prophylaxis method for skin damage after radiotherapy. We analyze the benefits of PRP as a prophylaxis method for skin damage after radiotherapy using an experimental model.

Methods. We conduct a double blind trial with rats. Twelve Wistar rats were used, 2 for obtaining the PRP and 10 for clinical and histological analysis.

Results. Data collected from the clinical analysis showed that those areas without PRP: 8 rats presented alopecia and 7 hypopigmentation. Total alopecia was present in 60%, partial alopecia in 20%, and 20% did not present alopecia. In those areas with PRP before radiotherapy: 4 presented alopecia and 3 hypopigmentation. There were no cases of total alopecia, 60% did not present alopecia and 40% presented partial alopecia. Data collected from the histological analysis showed 100% of mild-moderate atrophy in those areas with PRP. On the other hand, 80% of moderate-severe atrophy and 20% of mild-moderate atrophy was present on those areas without PRP.

Conclusions. The authors showed the benefit of PRP as a prophylaxis method for alopecia ($p < 0.05$) and hypopigmentation ($p < 0.1$) produced after radiotherapy in this experimental model.

Palabras clave	Plasma rico en plaquetas, Radioterapia, Radiodermatitis.
Nivel de evidencia científica	5 Investigación básica
Recibido (esta versión)	24 marzo/2016
Aceptado	5 mayo/2016

Key words	Platelet-rich plasma, Radiotherapy, Radiodermatitis.
Level of evidence	5 Bench research
Received (this version)	24 march/2016
Accepted	5 may/2016

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún interés financiero relacionado con el contenido de este artículo.

* Médico Residente, Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía.
** Cirujano Plástico Adjunto, Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía.
*** Radioterapeuta Adjunto, Centro de Oncología y Radioterapia.
**** Anatomopatólogo Adjunto, Servicio de Anatomía Patológica.
***** Médico Laboratorista, Servicio de Laboratorio.
Hospital Pasteur, Montevideo, Uruguay.

Artículo galardonado con el Primer Premio del Concurso Internacional de Residentes de la FILACP celebrado durante el XXI Congreso de la Federación Iberoamericana de Cirugía Plástica, Punta del Este (Uruguay), marzo de 2016, y con el Tercer Premio del Concurso de Residentes del Congreso del Cono Sur Americano, Rosario, (Argentina), octubre de 2015.



Introducción

La radioterapia aislada o en combinación con la quimioterapia o con la cirugía, es un pilar irremplazable en el tratamiento de ciertos tumores. Esta terapéutica trae consigo la aparición de complicaciones en la piel del paciente con impacto en su calidad de vida que puede perdurar años. Debemos destacar que los avances tecnológicos durante los últimos tiempos han reducido la incidencia de complicaciones asociadas a la radioterapia. Aun así, hay un porcentaje no despreciable de pacientes que presentarán daño en los tejidos expuestos a radiación (1).

La aparición de complicaciones vinculadas a la radioterapia incluyen alteraciones de la cobertura cutánea que además condicionan el tipo de reconstrucción a realizar y aumentan las complicaciones asociadas a la reconstrucción pudiendo implicar en ocasiones, la necesidad de una nueva intervención quirúrgica (2-4). (Fig. 1 y 2).

Los procesos de regeneración de tejidos, tanto a nivel óseo como de partes blandas, están mediados por mecanismos complejos intra y extracelulares en un proceso que aun no se encuentra del todo dilucidado (5-9). Aun así, sí está demostrada la importancia del rol de las plaquetas en este proceso, con un papel capital y decisivo (7-10). Numerosos estudios afirman el rol del plasma rico en plaquetas (PRP) en la regeneración tisular y estimulación del fibroblasto cutáneo. Ya ha sido publicado el uso de PRP como tratamiento después de la aparición de lesiones cutáneas fruto de la radioterapia, presentando buenos resultados (1). Pero no hemos encontrado publicaciones de uso de PRP activado para prevenir lesiones en

sectores a irradiar, valorando la eventual disminución de lesiones cutáneas.

El objetivo de este trabajo es evaluar si existe efecto beneficioso del plasma rico en plaquetas como profilaxis de las complicaciones cutáneas de la radioterapia en un modelo animal.

Material y método

Animales de estudio, condiciones de su hábitat y alimentación

Este estudio fue realizado con la autorización de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Utilizamos para el mismo 12 ratas Wistar de 250-300 gr. Dos de ellas fueron empleadas para la obtención del PRP por medio de la extracción de la totalidad de la volemia, previa anestesia. Las restantes ratas fueron mantenidas en casillas individuales en el Laboratorio de Entrenamiento y Experimentación en Microcirugía del Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía del Hospital Pasteur (Montevideo, Uruguay), avalado por la CHEA. La alimentación y bebida de los animales se realizó a demanda.

Obtención de PRP

Realizamos la extracción intracardiaca de la volemia de la rata bajo anestesia por medio de inyección intraperitoneal de Ketamina 50 mg/Kg y Xilazina 6 mg/Kg. Obtuvimos 8 ml de sangre por rata. La extracción fue realizada con jeringa estéril con anticoagulante. El recuento plaquetario inicial en la sangre de rata fue de 716 mil/uL. La sangre fue centrifugada a 1.300 revoluciones durante 8 mi-

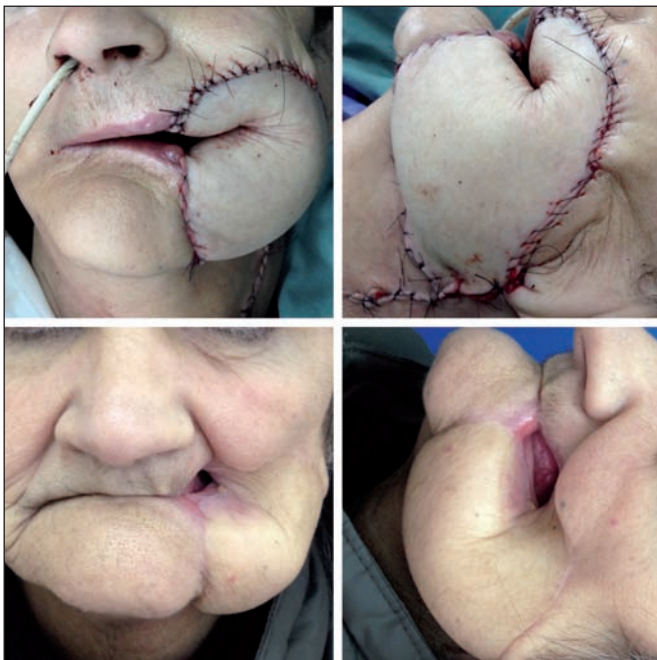


Fig. 1. Efectos perjudiciales de la radioterapia en cirugía reconstructiva. Paciente de 56 años con tumor maligno en mucosa oral que requirió resección con márgenes oncológicos y reconstrucción con colgajo libre anterolateral de muslo. Postoperatorio inmediato y secuela tras radioterapia.



Fig. 2. Efectos perjudiciales de la radioterapia en cirugía reconstructiva. Paciente de 36 años con tumor maligno en seno maxilar derecho que requirió resección oncológica y de tejidos suprayacentes, incluyendo hemiariz derecha. Reconstrucción con colgajo libre anterolateral de muslo. Postoperatorio inmediato y secuela con colapso nasal, fibrosis y cambio de coloración tras radioterapia.

nutos, a temperatura ambiente. Descartamos las capas inferiores del producto. El sobrenadante constituyó el PRP. Obtuvimos 600 μ l de PRP por rata con un recuento de $2.084 \cdot 10^3 / \mu$ l. Activamos el mismo con una solución al 2% de cloruro de Calcio. De estas ratas sacrificadas que no recibieron radioterapia, tomamos muestras de piel sana como parámetro de piel normal no irradiada.

Administración de PRP

Las 10 ratas restantes fueron anestesiadas bajo la misma técnica para la administración de PRP. Realizamos la depilación con crema depilatoria evitando lesionar la piel. Colocamos las ratas en decúbito ventral y delimitamos dos áreas de piel: craneal y caudal. Una de ellas recibió 600 μ l de PRP profiláctico de manera aleatoria, y

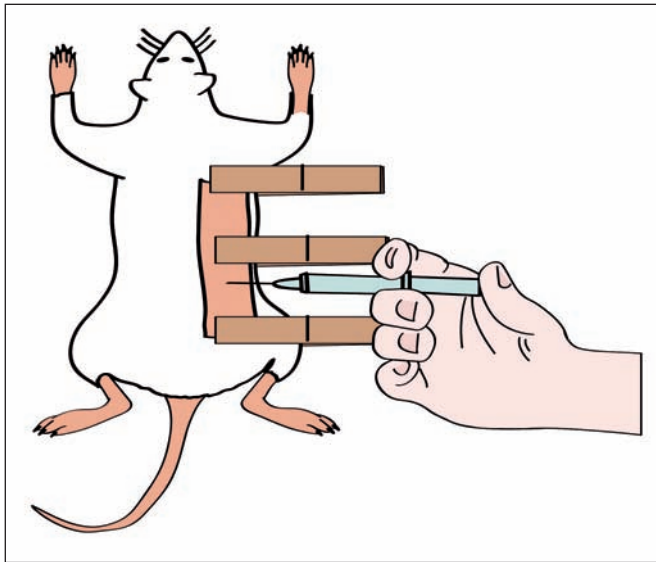


Fig. 3. Colocación de PRP en ratas: se hizo de manera aleatoria, en zona céfalica o zona caudal, 600 μ l de PRP.

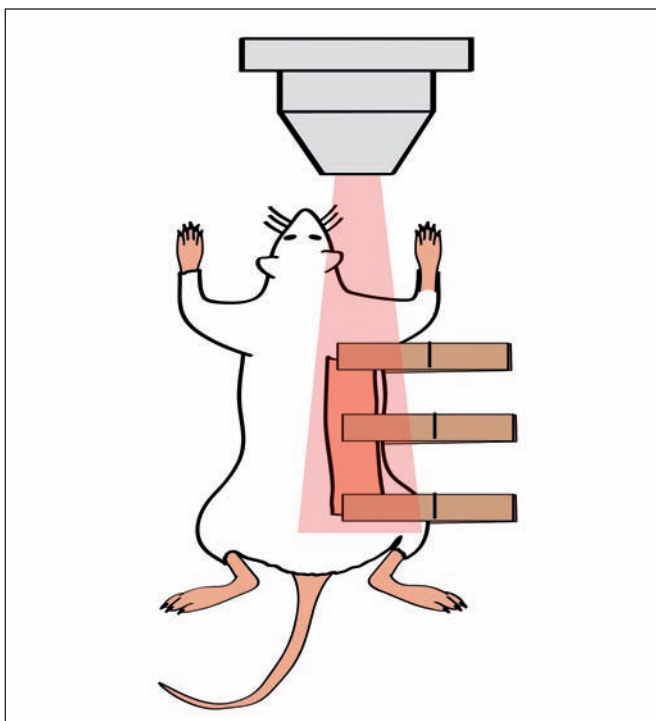


Fig. 4 A y B. Radioterapia en ratas: únicamente sobre la piel a estudiar.

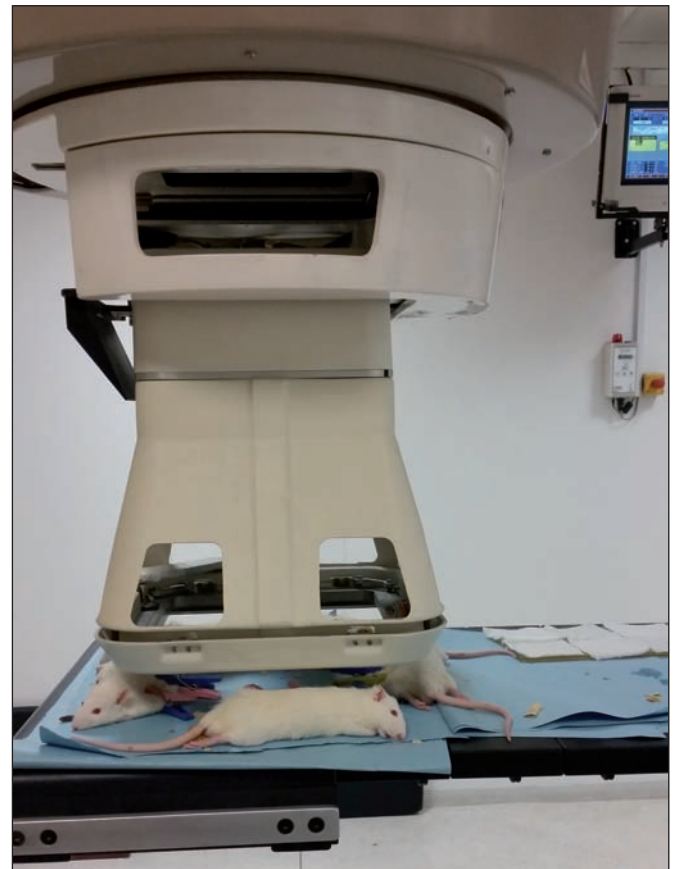
ambas fueron irradiadas (Fig. 3). Cada rata fue identificada mediante marcación en las orejas. Guardamos la información de la correlación entre el sitio de piel con infiltración de PRP y la identificación de la rata hasta la finalización del estudio, evitando sesgos.

Radioterapia

Al cuarto día de la administración de PRP aplicamos la radioterapia. Empleamos la misma técnica anestésica para la irradiación. La radioterapia en las ratas fue a dosis única de 20 Gy (11-14) (Fig. 4). Las 10 ratas recibieron radioterapia el mismo día. Transitoriamente, durante la sesión de radioterapia y con el objetivo de no dañar órganos próximos, colocamos palillos en la piel a irradiar. Los animales fueron depositados nuevamente en jaulas individuales bajo continua vigilancia para evitar posibles agresiones y daño cutáneo inducido por el mismo animal.

Observación

Controlamos clínicamente a los animales y recogimos documentación fotográfica a las 72 horas de la irradiación para identificar cambios agudos. Registramos los cambios de la piel de las ratas con presencia o ausencia de eritema, alopecia, adelgazamiento cutáneo y necrosis. El control fue simple ciego por un tercero ajeno al estudio. Acorde a la gravedad del cambio clínico, graduamos en: ausencia de alopecia, alopecia parcial o total. Registramos la hipopigmentación como: ausencia o presencia. Guardamos dichos datos, con la



correspondiente identificación de la rata, hasta la finalización del estudio.

Estudio anatomopatológico

Sacrificamos a los animales a los 45 días y enviamos las muestras de la piel irradiada con utilización de PRP y sin él para estudio anatomopatológico. Enviamos 2 biopsias por rata: una de la zona cefálica y otra de la zona caudal. La rotulación de las muestras no incluía datos que señalaran qué biopsia correspondía a la piel con PRP previo a la irradiación.

Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% y procesadas en laboratorio de forma convencional con inclusión en parafina y cortes de 5 micras de espesor coloreados con hematoxilina-eosina. Desde el punto de vista microscópico, evaluamos los cambios de la epidermis y de la dermis. Particularmente, calificamos la presencia de folículos pilosos, fibroblastos, colágeno, exudado inflamatorio y vasos, comparando con una biopsia de piel de rata no irradiada. Empleamos un método semicuantitativo para evaluar la intensidad de los cambios del 1 al 3. Recogimos documentación fotográfica de los preparados.

Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado para los cambios clínicos y resultados anatomopatológicos fue el t de Student. La significancia considerada fue de un $p < 0.05$.

RESULTADOS

Control clínico a las 72 horas de la irradiación

Realizamos el primer control clínico a las 72 horas de la irradiación.

Respecto a la alopecia, constatamos, en el grupo de muestras con PRP previo a la radioterapia, que el 0% presentaron alopecia total, y el 4 (40%) alopecia parcial. El

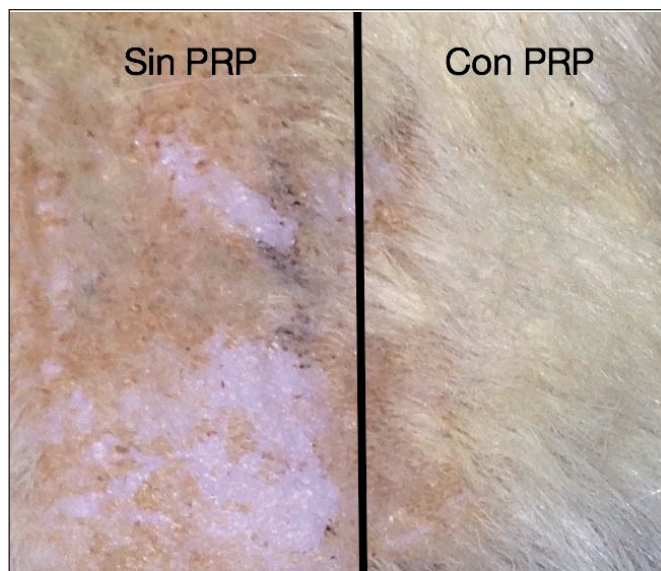
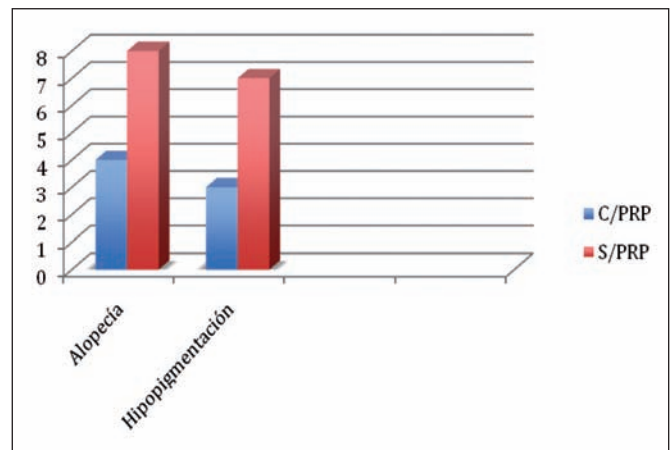
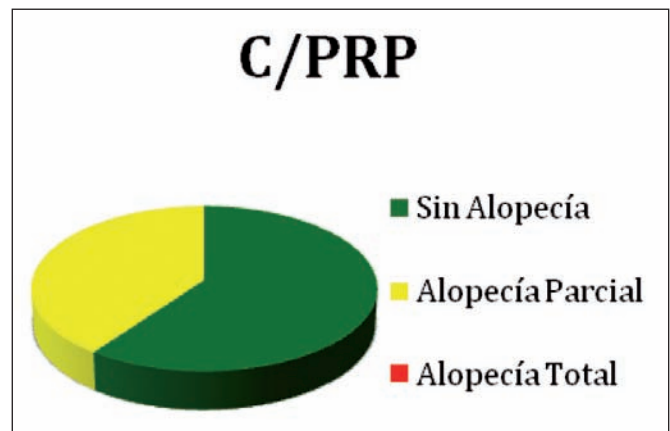
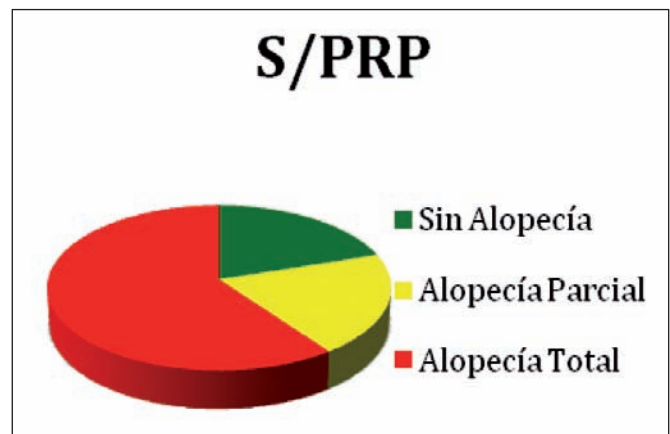


Fig. 5. Sector de piel sin colocación de PRP (izquierda) y con PRP (derecha) a las 72 horas de recibir radioterapia a dosis de 30 Gy.

Gráfica 1. Alopecia e hipopigmentación.



Gráfica 2. Severidad de la alopecia.



mayor porcentaje (60%) de los sectores de piel con PRP no presentó alopecia (Fig. 5) (Gráfica 1). En el grupo sin PRP, 8 presentaron alopecia (80%), 6 presentaron alopecia total (60%), y 2 alopecia parcial (20%). Constatamos los únicos casos de alopecia total en piel sin PRP previo a la radioterapia (Gráfica 2). La comparación estadística de los grados de alopecia mostró una diferencia positiva a favor del grupo PRP ($p < 0.05$). Constatamos la presencia de hipopigmentación en el grupo con PRP en 3 muestras (30%) y del grupo sin PRP en 7 (70%). La variable de hipopigmentación presentó una diferencia con $p < 0.1$. No se presentaron casos de eritema ni necrosis con formación de úlceras.

Estudio anatomopatológico

Observamos en todas las muestras grados variables de adelgazamiento de la epidermis, exudado inflamatorio y disminución del número de folículos pilosos. Cuantificamos el adelgazamiento de la epidermis en atrofia leve moderada o moderada-severa. De los 10 sectores con PRP, todos presentaron atrofia leve-moderada. De los 10 sectores irradiados sin PRP, 8 presentaron atrofia moderada-severa y 2 atrofia leve-moderada. Ninguna muestra presentó ulceración. El exudado linfocitario presente fue de entidad leve, subepitelial, a linfocitos pequeños y dispersos. No observamos exoserosis ni exocitosis. No observamos cambios en dermis en el número de fibroblastos, características del colágeno, ni en los vasos. No encontramos diferencias en la disminución de folículos pilosos ni en la entidad y características del exudado inflamatorio entre ambas (Fig. 6).

Discusión

El tratamiento adyuvante con radioterapia es necesario en numerosos tratamientos de tumores malignos. Si bien su objetivo principal es reducir la recurrencia y mejorar la supervivencia, la radioterapia puede causar efectos negativos con alta morbilidad. Es por ello que las lesiones por radioterapia en la piel constituyen un gran desafío para los cirujanos (15).

En la cirugía de reconstrucción por cáncer de mama, se estima que un tercio de las pacientes que reciben radioterapia necesitarán de una segunda cirugía para corregir los daños cutáneos inducidos por la radioterapia (16).

Independientemente del tipo de cáncer que requiera radioterapia, ha llegado el momento de que ésta ofrezca los mismos resultados oncológicos disminuyendo las

complicaciones y generando un alto grado de satisfacción tanto para el paciente como para el cirujano (17).

Existen publicaciones de modelos experimentales en animales para valorar el daño inducido por la radioterapia que utilizan ratones, cerdos y ratas. Estos estudios están diseñados para valorar la presencia de cierto tipo de daño, como la radiodermatitis, y no el espectro completo del daño que se aprecia en la clínica, como la formación de úlceras (18). Con el objetivo inicial de lograr la mayor cantidad posible de cambios producidos por la radioterapia en la piel, optamos por un modelo de experimentación animal en ratas (11).

Realizando un análisis de la bibliografía existente sobre el daño cutáneo inducido por radioterapia en ratas, concluimos que la dosis de 20 Gy nos brindaría seguridad para evitar daños mayores en la rata. La dosis fue aprobada por el Comité de Ética Animal de nuestro hospital. Tanto la posición de la rata, como la colocación de dos pinzas para separar la piel del resto del organismo, tuvieron como finalidad el evitar en mayor medida la irradiación de los órganos vecinos (11, 14). En contra de lo que ocurre en el ser humano, el entrecruzamiento de derivados de la sangre en estos animales está avalado por la bibliografía.

El daño final que logramos en nuestro estudio resultó menor del esperado, si bien la evidencia sugería lo contrario y la planificación se ajustó a los protocolos ya existentes.

Independientemente del sector de piel analizado, con o sin aplicación de PRP, no se presentaron algunos cambios clínicos descritos en piel, como puede ser la presencia de úlceras, atrofia cutánea o eritema. Especulamos que para la formación de las mismas puede ser necesaria una mayor dosis, ya sea en graduación en una sesión única, o mediante un mayor número de sesiones.

Por otro lado, los cambios clínicos cutáneos de alopecia e hipopigmentación nos permitieron analizar resultados con valores estadísticamente significativos a favor del uso del PRP. Evidenciamos una disminución de la alopecia y la ausencia de hipopigmentación en los sectores infiltrados con PRP. Aún en los casos que presentaron alopecia en el sector de piel con PRP, esta alopecia fue más severa en el sector sin PRP. En ninguno de los casos se presentó mayor severidad en el sector con PRP, lo que nos da indicios de que su uso no es perjudicial. La realización del análisis clínico simple ciego y por parte de un tercero, aportó seguridad a nuestro estudio.

El PRP actúa como reserva de numerosos factores de crecimiento (19). Se trata de una sustancia autóloga, 100% biocompatible, segura y económica. Desde hace ya mucho tiempo, el PRP se utiliza para la regeneración ósea, para disminuir inflamación, disminuir los tiempos de curación de las heridas y la pérdida sanguínea, entre otros. Su uso también se extiende al campo de la Medicina Estética, para mejorar la calidad de la piel, disminuyendo las arrugas y los signos de envejecimiento (20).

Entre los factores de crecimiento participantes contamos con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF),

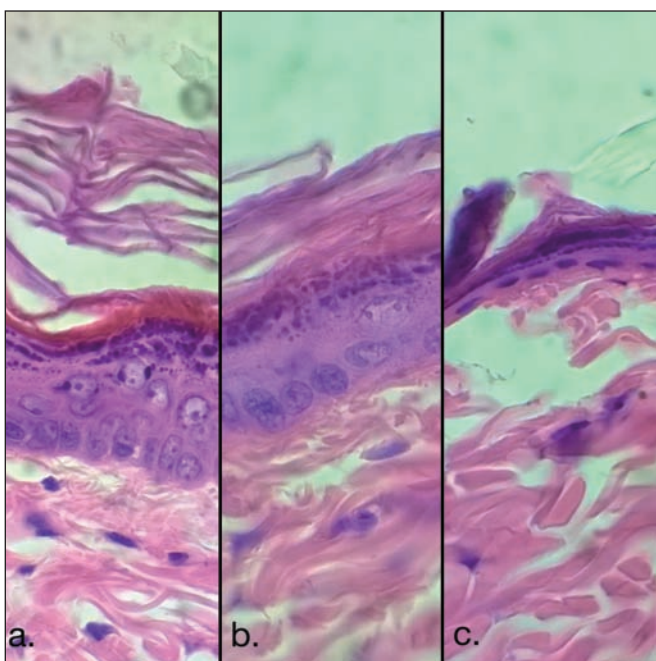


Fig. 6. Imágenes de microscopía óptica (hematoxilina/eosina, 100x). Comparación de biopsia de piel normal de rata no irradiada (a), biopsia de piel irradiada con PRP previo a la irradiación (b) y piel irradiada sin PRP (c). Se puede evaluar la atrofia cutánea correspondiente.

Factor de crecimiento de Tejidos TGF alfa, alfa 1, alfa 2, Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), factores de la coagulación y citoquinas entre otros. Juntos tienen un rol importante en la reparación de los tejidos dañados. La irradiación, al cuarto día de la aplicación del PRP, se realizó considerando los tiempos de vida media de los factores de crecimiento (21).

En el presente estudio logramos una adecuada concentración de plaquetas en el plasma (2.084 103/ μ l). Obtuvimos la cantidad suficiente del mismo como para realizar un habón en el tejido celular subcutáneo. Quizás, de haber conseguido más PRP y haber podido inyectar mayor cantidad del mismo o en más de una oportunidad, los resultados hubieran sido más contundentes.

Los cambios anatomopatológicos fueron comparables con los clínicos. No evidenciamos daños sustanciales por la radioterapia, y por ello creemos que no pudimos demostrar un beneficio radical en el uso del PRP. Apreciamos cambios cutáneos vinculables a la radioterapia a nivel de la epidermis con presencia de adelgazamiento de la misma. El adelgazamiento cutáneo menor en la muestra del piel con utilización de PRP, fue significativo.

Conclusiones

Son tan claros los efectos deletéreos de la radioterapia como su importancia en el tratamiento de ciertos tumores. En nuestro estudio, la radioterapia dañó la piel de las ratas generando clínicamente alopecia e hipopigmentación, y microscópicamente adelgazamiento cutáneo. Los cambios inducidos por la radioterapia con la metodología de estudio utilizada alcanzaron para demostrar el beneficio del uso del plasma rico en plaquetas como profilaxis de la alopecia ($p < 0.05$) e hipopigmentación ($p < 0,1$) inducida por la radioterapia en un modelo experimental. Se demuestra así un nuevo camino en la investigación de esta gran problemática contemporánea.

Agradecimientos

A la Dra. Viviana Escobar, Residente del Departamento de Anatomía Patológica, y a la Dra. Lucia Moller, Residente del Departamento de Anatomía Patológica, por su contribución a la realización de este estudio.

Dirección del autor

Dra. Lucía d'Oliveira Pazos
Hospital Pasteur
Servicio de Cirugía Plástica y Microcirugía
Larravide s/n esq. Cabrera
Código postal 11400
Montevideo, Uruguay
dradoliveirapazos@gmail.com

Bibliografía

1. Iervolino V., Di Costanzo G., Azzaro R., Diodato A.M., Addolorata Di Macchia C., Di Meo T., Petruzzello A., Loquercio G., Muto P., Apice G., Cacciapuoti C. Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis. *Support Care Cancer*. 2013; 21: 287-293.
2. Kronowitz S.J. Current status of autologous tissue-based breast reconstruction in patients receiving postmastectomy radiation therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130:282-292.
3. Lee B.T., A Adesiyun T., Colakoglu S., et al. Postmastectomy radiation therapy and breast reconstruction: An analysis of complications and patient satisfaction. *Ann Plast Surg*. 2010;64:679-683.
4. Disa J.J., McCarthy C.M., Mehrara B.J., Pusic A.L., Cordeiro P.G. Immediate latissimus dorsi prosthetic breast reconstruction following salvage mastectomy after failed lumpectomy irradiation. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121(4):159e-164e.
5. Beasley L. S., Einhorn T. A. Role of growth factors in fracture healing. En: *Skeletal Growth Factors*. Ed.: Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2000. Pp. 311-322.
6. Bhanot S., Alex J. C. Current applications of platelet gel in facial plastic surgery. *Facial Plast. Surg*. 2002; 18: 27-33.
7. Anitua E., Andia L., Ardanza B., et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 2004; 91: 4-15.
8. Buckwalter J. A., Einhorn T. A., Bolander M. E., et al. Healing of musculoskeletal tissues. En: *Fractures in Adults*. Ed.: Rockwood C.A., Bucholz R.W., Green D.P. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. Pp. 261-304.
9. Anderson, J. M. The cellular cascades of wound healing. En: *Bone Engineering*. Ed.: Davies J.E. Emsquared inc., Toronto, 2000. Pp. 81-93.
10. Marx R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg*. 2004;62: 489-496.
11. Takikawama M., Nakamura S., Nambu M., Sasaki K., Yanagibayashi S., Azuma R., Yamamoto N., Kiyosawa T. New model of radiation induced skin ulcer in rats. *J Plast Surg Hand*. 2011;45(6):258-262.
12. Felice P., Nelson N., Page E., Deshpande S., Donneys A., Rodriguez J., Buchman S. Amifostine reduces radiation induced complications in a Murine model of expander based breast reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg*. 2014;134: 551e-650e.
13. Takikawa M. et al. Protective effect of prostaglandin E1 on radiation induced proliferative inhibition and apoptosis in keratinocytes and healing of radiation induced skin injury in rats. *J. Radiat. Res*. 2012; 53, 385-394.
14. Rifkin L. H. et al. An athymic rat model of cutaneous radiation injury designed to study human tissue based wound therapy. *Radiation Oncology*. 2012, 7: 10.1186/1748-717X-7-68.
15. Kronowitz S.J., Robb G.L. Breast reconstruction with post mastectomy radiation therapy: Current issues. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114:950-960.
16. Tran N.V., Chang D.W., Gupta A., Kroll S.S., Robb G.L. Comparison of immediate and delayed free TRAM flap breast reconstruction in patients receiving postmastectomy radiation therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108: 78-82.
17. Rogers N.E., Allen R.J. Radiation effects on breast reconstruction with the deep inferior epigastric perforator flap. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109:1919-1924.
18. Prasad K.N., VanWoert M.H. Radioprotective action of Dihydroxyphenyl ethylamine (Dopamine) on whole-body X irradiated rats. *Radiat Res*. 1969;37:305-315.
19. Frechette J.P., Martineau I., Gagnon G. Platelet-rich plasmas: Growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*. 2005;84:434-439.
20. Tatsuro K., Jiro K., Kazuhiko M., et al. Platelet-Rich Plasma with Basic Fibroblast Growth Factor for Treatment of Wrinkles and Depressed Areas of the skin. *Plast. Reconstr. Surg*. 2015; 136 (5): 931-939.
21. Landesberg R., Roy M., Glickman R.S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58:297-300; discussion 300-301.