

TRATAMENTO CRIOGÊNICO PARA ELEVAR A QUANTIDADE DE MACROPOROS NO PLASMA RICO EM FIBRINA UTILIZADO COMO SCAFFOLD EM ENGENHARIA TECIDUAL

CRYOGENIC TREATMENT TO INCREASE THE AMOUNT OF MACROPORES IN PLASMA RICH IN FIBRIN USED AS SCAFFOLD IN TISSUE ENGINEERING

Sarah Arangurem KARAM¹; Alissa Schmidt SAN MARTIN²; Thaís MAZZETTI³; Marcus Cristian Muniz CONDE⁴; Luiz Alexandre CHISINI⁵; Flávio Fernando DEMARCO⁶

1 - Mestranda em Epidemiologia, Programa de Pós-Graduação em epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas;

2 - Estudante de Graduação, Departamento de Odontologia Restauradora, Universidade Federal de Pelotas;

3 - Estudante de Graduação, Departamento de Odontologia Restauradora, Universidade Federal de Pelotas;

4 - Professor e Doutor, Curso de odontologia, Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES);

5 - Estudante de Doutorado e Mestre, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas;

6 - Professor e Doutor, Departamento de Odontologia Restauradora, Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

Objetivos: Investigar se o tratamento criogênico é capaz de elevar a quantidade de macroporos no Plasma Rico em Fibrina (PRF) utilizado como *scaffold* sem destruir totalmente sua integridade estrutural. Métodos: Três amostras de sangue (10 ml) foram processadas para obtenção do PRF. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) e armazenadas por sete dias e um ano. Como controle foi utilizado um PRF imediatamente após sua obtenção. Após os respectivos períodos de armazenamento, cada PRF foi preparado para análises histológicas. Três áreas representativas de cada amostra foram selecionadas e avaliadas no *software* Image J quanto ao tamanho dos poros: macro $\geq 50 \mu\text{m}$ e microporos $< 50 \mu\text{m}$. Resultados: Após sete dias e um ano

de criopreservação foi observada uma área total de macroporos compreendendo 76% e 82% do PRF, respectivamente. No PRF processado imediatamente após sua obtenção observamos 64% de macroporos. Além disso, a criopreservação promoveu uma alteração do arranjo estrutural do PRF. Conclusão: O tratamento criogênico do PRF a -80°C (por 7 dias ou um ano) foi capaz de elevar a quantidade de macroporos mantendo uma considerada quantidade de microporos. Com o aumento do tempo de tratamento criogênico um maior número de macroporos foi observado.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; Fibrina; Engenharia tecidual.

INTRODUÇÃO

O Plasma Rico em Fibrina (PRF) é um concentrado plaquetário que tem sido empregado em diversas técnicas de enxertos para regeneração tecidual guiada apresentando excelentes resultados¹⁻⁶. O PRF é constituído por uma rede de fibrina rica em biomoléculas capazes de favorecer a adesão e migração celular^{1,7,8}. Desta forma, sua utilização como *scaffold* natural em estudos focados na regeneração tecidual tem sido objeto de investigação⁸⁻¹⁰.

Scaffolds são estruturas porosas e tridimensionais que devem atuar como análogos à matriz extracelular (MEC). Além de fornecer sustentação estrutural, os *scaffolds* devem fornecer sítios específicos de ancoragem, como as integrinas (RGD) que desempenham papel fundamental no processo de adesão celular. Ademais, devem atuar como guias biológicos capazes de regular o comportamento celular¹¹. Tais estruturas podem ser classificadas quanto à origem de seu material constituinte: naturais ou sintéticos¹⁰. *Scaffolds* naturais são compostos por proteínas e

polissacarídeos originados de estruturas biológicas¹². A fibrina, o colágeno e o ácido hialurônico são exemplos de materiais base para a confecção de *scaffolds* naturais. Além disso, é crescente a utilização de polímeros naturais para tal finalidade, principalmente pela possibilidade de produzirem biomateriais biodegradáveis e biomiméticos que são capazes de manter uma prévia da organização biológica da sua MEC de origem^{11,13,14}.

Scaffolds à base de polímeros sintéticos têm suas propriedades físico-químicas (índice de degradação, tamanho das microporosidades e a resistência mecânica) altamente controláveis. Os polímeros sintéticos mais utilizados para a construção de *scaffolds* são ácido poli-L-lático (PLLA), ácido poli glicólico (PGA) e seus copolímeros como o ácido poli lático coglicólico (PLGA). Contudo, eles não possuem comportamento bioativo^{11,13,15}. Recentemente materiais biológicos como o PRF e o colágeno têm sido utilizados como *scaffolds* naturais, devido ao fato de possuírem receptores de superfície que aumentam a compatibilidade

celular^{7,14}. Diversas moléculas bioativas como as interleucinas e os fatores de crescimento são observadas na estrutura do PRF⁷. Além disso, sua forma de obtenção é relativamente simples, sendo necessária apenas uma centrifugação sanguínea com uma força de 400 gravidades, descrita inicialmente por Choucroun *et al.*¹⁶ (2001).

Estudos têm demonstrado que o tamanho, o formato e a disposição dos poros em diversos tipos de *scaffolds* podem influenciar no comportamento das células^{14,17,18} além de influenciar na sua diferenciação¹⁹. O cultivo de células em *scaffolds* de PRF tem se mostrado complexo, principalmente no que diz respeito à colonização no interior da rede de fibrina, que apresenta uma elevada quantidade de microporos, dificultando o cultivo e a migração celular no interior destes *scaffolds*. O cultivo de células no PRF se dá basicamente através da sementeira direta de células sobre a superfície desse *scaffold*. No entanto, esse método tem demonstrado não apresentar uma favorável penetração das células devido a consistência sólida da fibrina. Assim, estudos têm explorado a fragmentação mecânica do PRF para favorecer o cultivo celular^{9,10,20}. No entanto, estes métodos acabam destruindo completamente a organização do PRF, que é muito semelhante ao coágulo sanguíneo normal²¹.

Características estruturais dos *scaffolds*, como tamanho e formato dos poros e diâmetro das fibras, exercem significativa influência sobre propriedades celulares (migração, proliferação e diferenciação)^{19,22-25}. Nesse contexto, a integridade estrutural do PRF é de suma importância quando se objetiva utilizar tal estrutura como *scaffold*. Além disso, outro importante fator que coordena a atividade biológica das células compreende a apresentação dos fatores de crescimento pelo *scaffold*²⁶. Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias que possibilitem aumentar a porosidade do PRF, sem destruir completamente sua integridade, é imprescindível na utilização desse concentrado em terapias regenerativas que utilizam princípios da engenharia tecidual. Assim, o presente estudo investigou se o tratamento criogênico é capaz de elevar a quantidade de macroporos no Plasma Rico em Fibrina utilizado como *scaffold* sem destruir totalmente sua integridade estrutural.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sob parecer 1.989.692. Amostras de sangue foram obtidas a partir de doação de um dos pesquisadores (LAC). Três amostras de sangue foram coletadas em tubos de coleta de sangue a vácuo de 8ml sem anticoagulantes e imediatamente centrifugadas como descrito por Choucroun *et al.*¹⁶ (2001). Brevemente, cada recipiente foi centrifugado por 10 minutos com uma força G de 400 através da seguinte equação (**FCR**: Força centrífuga resultante expressa em G; **RPM**: rotações por minuto; **R**: raio da centrífuga): $FCR(G) = 1,12 \cdot R \cdot (RMP/1000)^2$.

Após a centrifugação, os recipientes foram conduzidos para uma capela de fluxo laminar em condições estéreis para a manipulação do PRF. Com uma pinça estéril, o PRF foi removido e cortado cuidadosamente abaixo da região do "buffy coat". Esta região é extremamente importante, pois concentra a maior parte das células brancas e plaquetas após o processo de centrifugação. A primeira amostra foi submetida à criopreservação por 7 dias

em um ultrafreezer (-80°C). A segunda foi criopreservada por um ano sob as mesmas condições. A última amostra foi imediatamente imersa em formol a fim de servir como controle. Após 24 horas, as amostras foram emblocadas em parafina sendo realizada a microtomia de 3µm de espessura, seguido da desidratação e diafanização das secções histológicas. Então, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E).

Cada lâmina foi levada ao microscópio óptico para avaliação das características histológicas, sendo realizada a tomada digital de imagens (n=10) da rede de fibrina. Três dessas imagens, as quais foram consideradas representativas da estrutura do PRF, foram selecionadas e a mensuração da área dos poros foi realizada através do Software Image J[®]. Inicialmente, a escala do software foi calibrada de acordo com as imagens utilizadas. A cor das imagens foi transformada em formato binário (preto e branco) e o contraste foi ajustado para reduzir oscilações bruscas nos níveis de cinza. Assim, foi utilizada a função *Analyze Particles*. Essa função permite a obtenção do desenho de cada poro, que foram contrastados com a imagem original. Quando observadas divergências, estas foram alteradas manualmente. Com o desenho de todos os poros ajustados, a função foi novamente selecionada calculando automaticamente a área ocupada por cada poro. Para análise dos dados, os poros foram categorizados de acordo com o tamanho: macro ≥ 50µm e microporos < 50µm. Desta forma, a quantidade de poros presentes foi contada e a área de cada poro foi quantificada, assim como a proporção de macro/microporos presentes nos diferentes períodos de armazenamento. Os resultados obtidos foram analisados descritivamente.

RESULTADOS

O grupo controle apresentou uma vasta rede com porosidade homogênea em coloração rosa claro. Em contrapartida, após 7 dias de criopreservação a -80°C observamos a formação de grandes poros permeados por pequenos poros similares aos da fibrina controle (Figura 1). De forma semelhante, o PRF criopreservado por um ano também apresentou grandes poros mesclados por pequenos poros.

Após análise no programa Image J (NIH), foi possível observar que a rede de fibrina no grupo controle apresentou cerca de 34 mil poros, enquanto que no PRF armazenado por 7 dias foram observados quase 8 mil poros. Após um ano de armazenamento, o número total de poros diminuiu para quase 7 mil, demonstrando uma gradual diminuição (Tabela 1). Além disso, a área média dos poros, assim como o tamanho máximo observado, apresentaram uma progressão diretamente proporcional ao tempo de armazenamento. O tratamento criogênico por sete dias elevou a proporção de macroporos para 76%, enquanto que

Tabela 1 - Descrição dos poros da rede de fibrina (em micrômetros) submetidas à criopreservação por diferentes períodos de tempo

Armazenamento	Número de poros	Área média (DP)	Tamanho mínimo	Tamanho máximo
Nenhum	34024	1.49 (3.60)	0.26	134.98
7 dias	7951	3.32 (14.61)	0.26	608.83
1 Ano	6846	5.10 (18.83)	0.26	707.64

*DP: Desvio Padrão

no grupo controle foi observado 64% de macroporos. Seguindo o mesmo padrão, a criopreservação por um ano elevou para 82% a quantidade de macroporos da rede de fibrina (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de macro e microporos na rede de fibrina submetida à criopreservação por diferentes períodos de tempo

Armazenamento	Microporos (%)	Macroporos (%)
Nenhum	35.89	64.11
7 dias	23.61	76.39
1 Ano	17.21	82.79

Macroporos \geq 50 μ m; microporos < 50 μ m

DISCUSSÃO

O PRF tem se mostrado promissor em diversas terapias que buscam a regeneração de tecidos periodontais, ósseos e pulpares^{1, 2, 4-6, 27-30}. No entanto, sua utilização como *scaffold* natural tem sido pouco investigada principalmente pela dificuldade de semear células no interior do coágulo de fibrina, que é semelhante ao coágulo sanguíneo - sem uma quantidade significativa de macroporos²¹. Assim, o presente estudo demonstrou que o tratamento criogênico do PRF é capaz de elevar consideravelmente a quantidade de macroporos presentes no PRF sem destruir totalmente o arranjo da rede de fibrina, podendo favorecer a semeadura direta de células-tronco.

O tratamento criogênico é uma ferramenta simples e pode ser realizado em qualquer laboratório, uma vez que se baseia em princípios básicos de química. Quando submetemos substâncias constituídas por H₂O, como o caso do PRF, a temperaturas abaixo de 4°C, essas substâncias tendem a aumentar o seu volume devido à dilatação anômala da água³¹. Dessa forma, ocorre uma

elevação no volume quando resfriadas de 4°C a 0°C, causando o rompimento de diversos microporos na rede de fibrina³². Tal acontecimento causou um aumento no tamanho médio dos poros da fibrina. Através da análise histológica, é possível observar uma alteração evidente na arquitetura das fibras do PRF após 7 dias de criopreservação. No entanto, esta alteração é menos agressiva que a realização de secções no PRF, além de manter o conjunto totalmente unido, o que facilita sua utilização em engenharia tecidual. Além disso, observamos um aumento direto na quantidade de macroporos em relação ao tempo de criopreservação, que também parece influenciar no tamanho dos poros e a quantidade de macroporos formados. É importante ressaltar que mesmo com a elevação de macroporos uma grande quantidade de microporos foi observada, mesmo após um ano de tratamento criogênico.

A manutenção de microporos é um fator importante para que o *scaffold* não perca a capacidade de adesão celular, uma vez que a quantidade e a forma dos poros em um *scaffold* são determinantes na adesão, proliferação e diferenciação celular^{24, 25}. Demarco *et al.*¹⁹ (2010) avaliou a influência de *scaffolds* produzidos com diferentes porógenos (sal e gelatina) na capacidade proliferativa e de diferenciação de células-tronco pulpares (DPSC) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Poros formados pela gelatina apresentam formatos esféricos, enquanto que poros formados pelos cristais de sal apresentam formatos irregulares. Este estudo observou que tanto o sal como a gelatina utilizada como agente porógeno em *scaffolds* de PLLA apresentaram semelhante proliferação celular. Além disso, pequenas modificações na expressão de marcadores de diferenciação celular (matrix extracellular phosphoglycoprotein - MEPE -, dentin sialophosphoprotein -DSPP- e dentin matrix protein 1 - DMP1) foram observadas entre os porógenos¹⁹. O fator que apresentou maior influência na proliferação

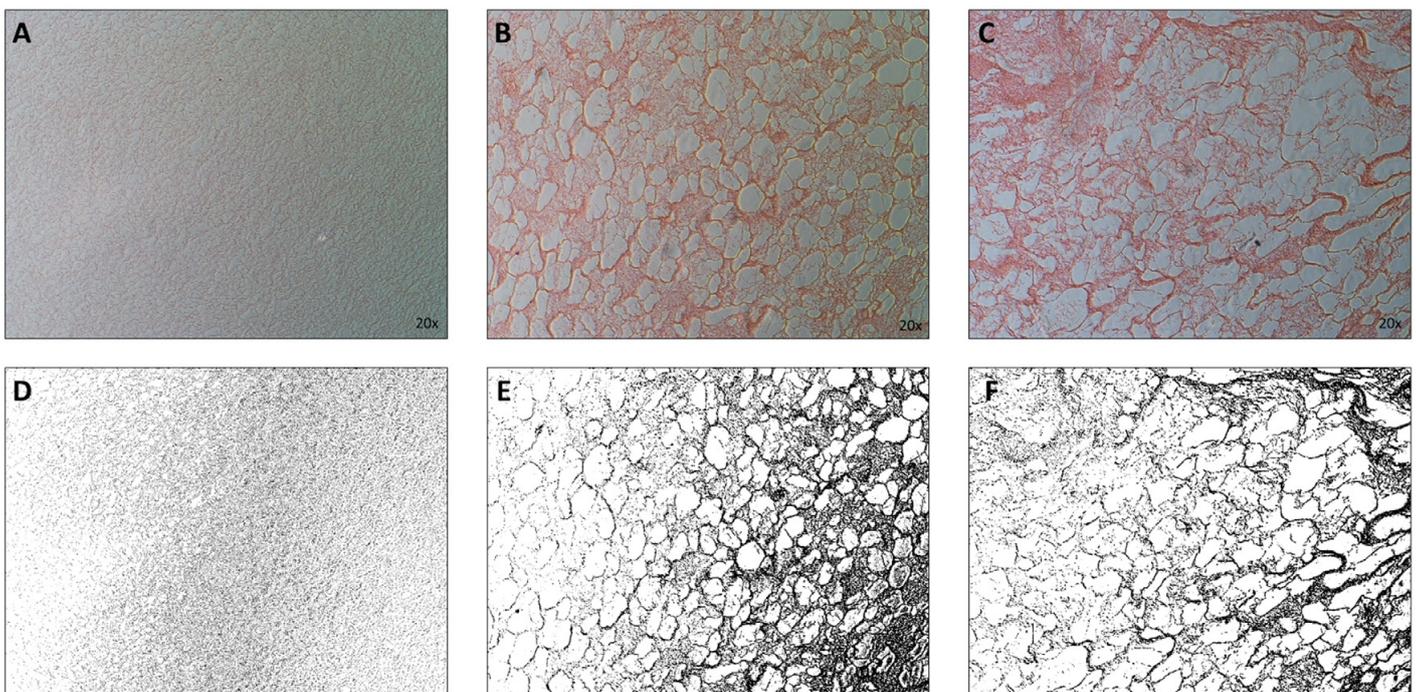


Figura 1 - Cortes histológicos do PRF submetido a diferentes períodos de criopreservação e suas imagens em formato binário. (A) PRF controle e sua imagem em coloração binária (D); (B) PRF submetido a 7 dias de criopreservação e sua imagem binária (E); (C) PRF submetido a um ano de criopreservação e sua imagem binária (F)

e diferenciação celular foi à presença de cortes de dentina circundando os *scaffolds* condicionados com ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Este ácido tem a capacidade de liberar os fatores de crescimento aprisionados no interior do tecido dentário, que, por sua vez, induziram uma melhor resposta nestes grupos¹⁹. A presença de moléculas bioativas é capaz de reger o comportamento celular e também apresenta um papel extremamente importante na colonização de *scaffolds*^{11, 12, 33}. Estudos que avaliaram a manutenção de fatores de crescimentos em tecidos criopreservados não observaram alterações significantes na expressão de biomoléculas^{34, 35}, no entanto, nenhum estudo avaliou se o mesmo ocorre com as biomoléculas presentes no PRF.

A avaliação estrutural PRF através do programa Image J[®], permitiu quantificar os poros presentes nos cortes histológicos além da proporção de macro/micro poros presentes nos diferentes períodos de armazenamento. Apesar da *International Union of Pure and Applied Chemistry* classificar microporos como menores de 2 nanômetros (nm), mesoporos entre 2 e 50 nm e macroporos aqueles maiores que 50 nm, a classificação nas ciências de biomateriais é realizada de forma diferente³⁶: macroporos são poros maiores ou iguais a 50 µm e microporos são aqueles menores que 50 µm²⁵. Desta forma, o presente estudo optou por classificar o tamanho dos poros da forma como a literatura tradicional realiza. Assim, os dados demonstraram um progressivo incremento do tamanho dos macroporos em relação aos microporos com o aumento do tempo de criopreservação do PRF.

O aumento do tamanho dos poros em *scaffolds* apresenta uma diminuição exponencial em suas propriedades mecânicas, no entanto, uma elevação na quantidade de macroporos favorece a permeabilidade inicial de células semeadas sobre os *scaffolds*, propiciando uma maior colonização inicial e consequente proliferação celular²⁵. Desta forma, um *scaffold* com canais de interconexão de 50 a 100 µm é desejada³⁷. Alguns estudos têm observado uma dificuldade na semeadura de células em *scaffolds* de PRF e têm desenvolvido estratégias para superar tal problema^{9, 10, 20}. Estas estratégias se baseiam principalmente na fragmentação da rede de fibrina para prover e aumentar a superfície de adesão celular. No entanto, essas técnicas destroem totalmente a rede de fibrina formada, formando pequenas micelas. Constatando que o tratamento criogênico do PRF pode prover uma elevação no tamanho de macroporos mantendo uma considerável parcela de microporos permeados em seus entornos, podemos hipotetizar que o PRF previamente submetido a tratamento criogênico, por apresentar uma maior porosidade, facilitaria o processo de semeadura e proliferação das células no *scaffold*. Desta forma, o emprego desta técnica pode ser um importante avanço para o desenvolvimento de terapias regenerativas^{8, 11, 15} principalmente em detrimento de técnicas que utilizam materiais sintéticos³⁸. No entanto, novas investigações devem ser feitas para testar esta hipótese, além de investigar se de fato a criopreservação não pode alterar as propriedades biológicas dos fatores de crescimentos presentes no PRF.

CONCLUSÃO

O tratamento criogênico do Plasma Rico em Fibrina a -80°C por 7 dias ou um ano foi capaz de elevar a quantidade de macroporos mantendo uma considerada quantidade de microporos. Com o aumento do tempo de tratamento criogênico um maior número de macroporos foi observado.

REFERÊNCIAS

- Borie E, Olivi DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltran V, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922-9.
- Rosello-Camps A, Monje A, Lin GH, Khoshkam V, Chavez-Gatty M, Wang HL, et al. Platelet-rich plasma for periodontal regeneration in the treatment of intrabony defects: a meta-analysis on prospective clinical trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(5):562-74.
- Srinivas BV, Rupa N, Halini Kumari KV, Prasad SS, Varalakshmi U, Sudhakar K. Root coverage using subepithelial connective tissue graft with platelet-rich plasma in the treatment of gingival recession: A clinical study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(Suppl 2):S530-8.
- Angelo T, Marcel W, Andreas K, Izabela S. Biomechanical Stability of Dental Implants in Augmented Maxillary Sites: Results of a Randomized Clinical Study with Four Different Biomaterials and PRF and a Biological View on Guided Bone Regeneration. *Biomed Res Int*. 2015;2015:850340.
- Georgakopoulos I, Tsantis S, Georgakopoulos P, Korfiatis P, Fanti E, Martelli M, et al. The impact of Platelet Rich Plasma (PRP) in osseointegration of oral implants in dental panoramic radiography: texture based evaluation. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2014;11(1):59-66.
- Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod*. 2013;39(3):319-26.
- Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*. 2015; 103(2):126-35.
- Chisini L, Karam S, Noronha T, Sartori L, San Martin A, Demarco F, et al. Platelet-Poor Plasma as a Supplement for Fibroblasts Cultured in Platelet-Rich Fibrin. *Acta stomatol Croat*. 2017;51(2):133-40.
- Chen Y, Niu Z, Xue Y, Yuan F, Fu Y, Bai N. Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-derived stem cells and platelet-rich fibrin. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(8):740-5.
- Sun CK, Zhen YY, Leu S, Tsai TH, Chang LT, Sheu JJ, et al. Direct implantation versus platelet-rich fibrin-embedded adipose-derived mesenchymal stem cells in treating rat acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;173(3):410-23.
- Conde MC, Chisini LA, Demarco FF, Nor JE, Casagrande L, Tarquinio SB. Stem cell-based pulp tissue engineering: variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature. *Int Endod J*. 2016;49(6):543-50.
- Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nor JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. 2011;22(1):3-13.
- Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nor JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater*. 2013;29(1):97-102.
- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2506-19.
- Chisini LA, Conde MC, Alcazar JC, Silva AF, Nor JE, Tarquinio SB, et al. Immunohistochemical Expression of TGF-beta1 and Osteonectin in engineered and Ca(OH)₂-repaired human pulp tissues. *Braz Oral Res*. 2016;30(1):e93.
- Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001 42:7.

17. Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(2):670-9.
18. Roosa SM, Kempainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):359-68.
19. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010;36(11):1805-11.
20. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):543-9.
21. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:355-67.
22. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81(10):695-700.
23. Yoo D. New paradigms in hierarchical porous scaffold design for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1759-72.
24. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4(7):518-24.
25. Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculoskeletal tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;61:922-39.
26. David M. Dohan Ehrenfest; Tomasz Bielecki RJGB, Sammartino MDCFIG. Do the Fibrin Architecture and Leukocyte Content Influence the Growth
27. Factor Release of Platelet Concentrates? An Evidence-based Answer Comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and
28. Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1145-52.
29. Sharma A, Pradeep AR. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2011;82(12):1705-12.
30. Pradeep AR, Rao NS, Agarwal E, Bajaj P, Kumari M, Naik SB. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(12):1499-507.
31. Yadav P, Pruthi PJ, Naval RR, Talwar S, Verma M. Novel use of platelet-rich fibrin matrix and MTA as an apical barrier in the management of a failed revascularization case. *Dent Traumatol.* 2015;31(4):328-31.
32. Conde MC, Chisini LA, Sarkis-Onofre R, Schuch HS, Nor JE, Demarco FF. A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation. *Int Endod J.* 2016.
33. Conde MC, Chisini LA, Grazioli G, Francia A, Carvalho RV, Alcazar JC, et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. *Braz Dent J.* 2016;27(6):633-40.
34. Kaku M, Kamada H, Kawata T, Koseki H, Abedini S, Kojima S, et al. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. *Cryobiology.* 2010;61(1):73-8.
35. Alcazar JC, Salas MM, Conde MC, Chisini LA, Demarco FF, Tarquinio SB, et al. Electrochemical Cathodic Polarization, a Simplified Method That Can Modified and Increase the Biological Activity of Titanium Surfaces: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(7):e0155231.
36. Anitua E, Muruzabal F, Pino A, Merayo-Llodes J, Orive G. Biological Stability of Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops After Storage of 3 Months. *Cornea.* 2013;32(10):1380-6.
37. Qu J, Nisolle M, Donnez J. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil Steril.* 2000;74(1):113-21.
38. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Disponível em http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t.pdf. Acessado em Agosto de 2016.
39. Hing KA. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistr. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2005;2(3):184-99.
40. Chisini LA, Conde MC, Correa MB, Dantas RV, Silva AF, Pappen FG, et al. Vital Pulp Therapies in Clinical Practice: Findings from a Survey with Dentist in Southern Brazil. *Braz Dent J.* 2015;26(6):566-71.

ABSTRACT

Objectives: To investigate whether the cryogenic treatment is able to increase the amount of macropores in the Fibrin Rich Plasma (PRF) used as scaffold, without destroying its structural integrity. **Methods:** Three blood samples (10 ml) were processed to obtain the PRF. The samples were stored in ultra-freezer (-80° C) and maintained for seven days or one year. As a control, PRF immediately after their acquisition was used. After each storage period, PRF was prepared for histological analysis. Three representative areas of each sample were selected and evaluated in Image J software for pore size: macro $\geq 50 \mu\text{m}$ and micropores $< 50 \mu\text{m}$. **Results:** After seven days and after one year of

cryopreservation was observed a total area of macropores comprising 76% and 82% of the PRF, respectively. In PRF processed immediately after collection was observed 64% of macropores. As observed, the cryopreservation changed the structural arrangement of the PRF. **Conclusion:** The cryogenic treatment of PRF at -80 ° C (for 7 days or one year) increased the amount of macropores maintaining a considerate amount of micropores. A greater number of macropores was observed as the cryogenic treatment time was increased.

KEYWORDS: Cryopreservation; Fibrin; Tissue engineering.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Luiz Alexandre Chisini

Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia,

Rio Grande do Sul, Brasil, Rua Gonçalves Chaves, 457, sala

501, CEP.: 96015560

Fone: (53) 3222-4439

E-mail: alexandrechisini@gmail.com